

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética
Laboratório de Genética do Comportamento



**FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS ENVOLVIDOS COM O CONSUMO DE
ETANOL E SEUS POSSÍVEIS CORRELATOS COMPORTAMENTAIS NAS LINHAGENS
DE RATOS LEWIS E SHR**

Ligia Fuhrmann Gonçalves de Oliveira

Florianópolis – SC
Novembro/2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética
Laboratório de Genética do Comportamento

**FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS ENVOLVIDOS COM O CONSUMO DE
ETANOL E SEUS POSSÍVEIS CORRELATOS COMPORTAMENTAIS NAS
LINHAGENS DE RATOS LEWIS E SHR**

Ligia Fuhrmann Gonçalves de Oliveira

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenadoria do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial para a
conclusão do curso.**

Orientador: Prof. Dr. André de Ávila Ramos
Co-orientador: Geison de Souza Izídio

Florianópolis – SC
Novembro/2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que passaram pela minha vida nesses cinco anos de faculdade e que, mesmo sem saber, me ensinaram mais do que posso expressar em palavras.

Ao Professor Dr. André Ramos, pela orientação, ensinamentos e confiança a mim dispensada. Por possibilitar que esta fase de minha vida fosse rica em experiências científicas.

Ao Geison Izídio, meu co-orientador, pessoa a quem devoto a mais sincera e efusiva admiração. Por tanto ter me ensinado e por ter me acompanhado desde os meus primeiros passos no laboratório. Pelo constante incentivo, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade.

Aos meus atuais e antigos amigos de laboratório, Elayne, Thaize, Ana Paula, Mariana, Natália, Janaína pelos bons momentos que passamos juntos ao longo dessa jornada.

À minha família, pela base sólida que sempre me deu força para encarar a vida de frente. A meus pais por, incondicionalmente, me apoiarem sempre.

RESUMO

O alcoolismo tem etiologia complexa, onde a participação de fatores genéticos é bem estabelecida. Estudos clínicos sugerem que existam diversas comorbidades presentes conjuntamente com o alcoolismo. As linhagens de ratos Lewis (LEW) e SHR diferem em relação a diversos modelos de ansiedade e de consumo de etanol. Assim, nosso estudo avaliou alguns fatores comportamentais e farmacológicos que podem estar envolvidos com o controle do consumo de etanol nestes animais. No primeiro bloco experimental (PBE), 44 ratos LEW e SHR (11/linhagem/sexo), isolados em gaiolas individuais com 8-9 semanas de idade, foram submetidos aos testes comportamentais de preferência de lugar (PL); campo aberto (CA); labirinto em cruz elevado (LCE); armazenamento de comida (AC); consumo de sacarina, quinino e etanol; e perda do reflexo postural (PRP) em resposta ao etanol, com coleta de sangue no momento da recuperação do reflexo. No segundo bloco experimental (SBE), avaliamos o efeito do isolamento social (IS) sobre o comportamento destas duas linhagens. Para isso, um grupo foi mantido em condições normais de agrupamento (4 animais/caixa) e outro foi submetido ao IS (1 animal/caixa) a partir de 8 semanas de idade (N=8/linhagem/sexo/tratamento). Posteriormente, todos os animais foram submetidos aos testes de PL, CA e LCE. No PBE, os ratos LEW e SHR diferiram no teste de PL quanto ao tempo gasto no compartimento familiar (SHR>LEW; $p<0,05$). No CA, eles diferiram na locomoção e tempo gastos no centro (SHR>LEW; $p<0,001$). No LCE ocorreu um efeito da linhagem no número de entradas nos braços abertos e fechados (LEW>SHR; $p<0,001$). No AC, ratos SHR guardaram e ingeriram mais ração do que os ratos LEW ($p<0,05$). As linhagens também diferiram no consumo de sacarina ($p<0,001$) quinino ($p<0,01$) e etanol forçado ($p<0,05$), com ratos SHR ingerindo mais do que ratos LEW. No consumo de etanol em livre escolha, ocorreu diferença entre linhagens somente em fêmeas, com ratas SHR

ingerindo mais do que as LEW ($p < 0,05$). No PRP, fêmeas recuperaram o reflexo mais rápido ($p < 0,001$) e com maior concentração de etanol no sangue do que machos ($p < 0,01$), mas não ocorreram diferenças entre as linhagens. No SBE, no teste de PL ocorreu diferença entre as linhagens somente nos animais agrupados, sendo que os ratos SHR passaram mais tempo no compartimento novo do que os LEW ($p < 0,05$). No CA, ocorreram diferenças no tempo e locomoção no centro ($\text{SHR} > \text{LEW}$; $p < 0,001$), sendo que o IS teve efeito apenas na linhagem SHR, com os ratos isolados apresentando os menores índices nestas medidas ($p < 0,05$). O IS diminuiu em ambas as linhagens a locomoção periférica ($p < 0,001$). No LCE, o IS provocou diferenças significativas no número e na % de entradas nos braços abertos, com os ratos LEW realizando maior número de entradas do que os SHR apenas em condição de IS ($p < 0,05$). A ANOVA revelou diferenças de linhagem e sexo no número de entradas nos braços fechados ($\text{LEW} > \text{SHR}$; $p < 0,05$; $F > M$; $p < 0,01$) e tempo nos braços abertos ($F > M$; $p < 0,05$). Em conclusão, no PBE os ratos LEW pareceram mais “ansiosos” que ratos SHR no CA, mas não no LCE, como esperado. No AC, os LEW pareceram mais impulsivos que os SHR. Os resultados inesperados nos testes PL e LCE sugerem que o IS influenciou o comportamento destas linhagens. No SBE, o IS pareceu causar um efeito ansiogênico, sendo que os ratos SHR parecem ser mais suscetíveis a estes efeitos do que os LEW. Isto sugere que as relações sociais durante o desenvolvimento são essenciais para o comportamento exibido durante a idade adulta.

Palavras-chave: Alcoolismo, ansiedade, comorbidades, modelo genético, ratos Lewis e SHR, fatores ambientais, isolamento social.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Alcoolismo	1
1.2 Alcoolismo e Comorbidades	2
1.2.1 Alcoolismo e Ansiedade	3
1.3 Ansiedade	4
1.4 Roedores na Pesquisa Biomédica	5
1.4.1 Modelo genético Lewis e SHR	6
1.5 Fatores ambientais	9
1.6 Correlações inter-testes	10
1.7 Hipótese	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Geral	13
2.2 Específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Animais	14
3.2 Desenho Experimental	15
3.3 Testes Comportamentais	16
3.3.1 Preferência de Lugar	16
3.3.2 Campo Aberto	18
3.3.3 Labirinto em Cruz Elevado	19
3.3.4 Armazenamento de Comida	19
3.3.5 Consumo Espontâneo de Sacarina, Quinino e Etanol	21
3.3.6 Perda do Reflexo Postural	21
3.3.7 Dosagem de Álcool no Sangue	22
3.4 Análise Estatística	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Primeiro bloco experimental	23

4.1.1 Preferência de Lugar	23
4.1.2 Campo Aberto	23
4.1.3 Labirinto em Cruz Elevado	24
4.1.4 Armazenamento de Comida	28
4.1.5 Consumo Espontâneo de Sacarina, Quinino e Etanol	28
4.1.6 Perda do Reflexo Postural	29
4.1.7 Dosagem de Álcool no Sangue	34
4.1.8 Matriz de Correlação	35
4.2 Segundo bloco experimental	38
4.2.1 Preferência de Lugar	38
4.2.2 Campo Aberto	38
4.2.3 Labirinto em Cruz Elevado	41
 5. DISCUSSÃO	 41
5.1 Primeiro bloco experimental	43
5.2 Segundo bloco experimental	52
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 57

1. Introdução

1.1 Alcoolismo

O alcoolismo pode ser definido como um transtorno comportamental complexo, com fatores genéticos, psicossociais e ambientais influenciando seu desenvolvimento e manifestações (Cloninger, 1987; Rodd *et al.*, 2007). A doença é geralmente progressiva e caracterizada pela falta de controle sobre a bebida, preocupação excessiva em obtê-la, uso do álcool apesar das consequências adversas, desenvolvimento de tolerância e sintomas de retirada, e pela atividade social e ocupacional comprometida (American Psychiatry Association, 1994).

O álcool é uma das poucas drogas psicotrópicas que tem seu consumo admitido e incentivado pela sociedade. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a mortalidade e limitação da condição funcional associada ao consumo de bebidas alcoólicas superam aquelas associadas ao tabagismo (World Health Organization, 2002). Calcula-se que mundialmente existam cerca de 2 bilhões de pessoas que consumam algum tipo de bebida alcoólica e mais de 76 milhões com problemas relacionados ao uso abusivo dessa substância (World Health Organization, 2004). O consumo abusivo de bebidas alcoólicas provoca direta ou indiretamente custos elevados para o sistema de saúde, pois as morbidades desencadeadas por ele são caras e de difícil manejo. Além disso, a exposição repetida ao álcool pode induzir alterações comportamentais como sedação, tolerância (redução dos efeitos comportamentais do álcool) ou sensibilização (aumento das respostas comportamentais produzidas pelo álcool) e sinais de abstinência (ex. ansiedade). Estas alterações têm sido consideradas fatores importantes para o desenvolvimento de dependência ao álcool (Koob e LeMoal, 1997; Darbra *et al.*, 2002).

Existe uma grande diferença interindividual na predisposição para o consumo de álcool e vulnerabilidade ao desenvolvimento do alcoolismo. Estudos baseados na história familiar, gêmeos monozigóticos e dizigóticos e indivíduos adotados, confirmam a participação de fatores genéticos na etiologia deste transtorno (Cloninger *et al.*, 1981; Hrubed e Omenn, 1981; Prescott e Kendler, 1999). Entretanto, o alcoolismo é atualmente entendido como o resultado de uma complexa interação de fatores genéticos, psicossociais e culturais. Neste sentido, é imprescindível o desenvolvimento de estudos sobre o mecanismo pelo qual o álcool produz sua atividade psicotrópica, na tentativa de tratar e prevenir os problemas relacionados ao seu consumo.

1.2 Alcoolismo e Comorbidades

Sabe-se que o alcoolismo, geralmente, não ocorre como um transtorno isolado. Quatro condições psiquiátricas são comumente presentes e provavelmente estão envolvidas na psicopatologia do alcoolismo: ansiedade, depressão, personalidade anti-social e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (Regier *et al.*, 1990; Grant e Harford, 1995). Alguns estudos sugerem que o perfil mais vulnerável à dependência do álcool é representado pelos indivíduos hiperativos, impulsivos e por aqueles que apresentam um traço de personalidade caracterizado por uma constante busca de novidades (Sher *et al.*, 2000; Mulder, 2002). Entretanto, os indivíduos alcoolistas geralmente diferem nos padrões de comorbidades psiquiátricas, perfis comportamentais e outras características mensuráveis, não possibilitando a determinação de um único perfil de personalidade associado com uma predisposição ao alcoolismo.

Cloninger (1987) sugeriu uma classificação tipológica para a dependência de álcool, dividindo os alcoolistas em dois tipos principais. O tipo I foi caracterizado por início tardio

no vício e pouca complicação social, apresentando, porém, maiores índices de ansiedade e depressão em comorbidade. Já o tipo II compreenderia um tipo de personalidade que manifesta altos níveis de impulsividade, busca de novidade e reduzida capacidade para evitar riscos. Alguns estudos têm mostrado que a agressividade, impulsividade, depressão e alcoolismo de início precoce (tipo II) comumente estão associados a uma redução da função serotoninérgica central (Soubrié, 1986). Da mesma maneira, sabe-se que indivíduos dependentes de álcool podem apresentar, naturalmente, maiores níveis de impulsividade (Boettiger *et al.*, 2007).

1.2.1 Alcoolismo e Ansiedade

O etanol atua no sistema nervoso central como um depressor, através da facilitação da abertura dos canais de cloreto acoplados aos receptores GABA (ácido gama-aminobutírico). Ele resulta em um decréscimo de tensão e inibição da ansiedade. A alta prevalência de uso de substâncias psicoativas em pacientes com transtornos de ansiedade (Regier *et al.*, 1990) corrobora a hipótese de redução de tensão, que prediz que indivíduos normalmente ansiosos ou estressados (em um estado sem droga), são mais sensíveis aos efeitos ansiolíticos do etanol e, portanto, mostram uma maior predisposição para consumirem esta droga (Conger, 1956). Tem sido proposto, portanto, que alguns indivíduos alcoolistas são predispostos a este comportamento devido à sua ansiedade inata (Schuckit e Hesselbrock, 1994; Cornelius *et al.*, 2003), sendo que estudos clínicos e epidemiológicos indicam uma comorbidade entre ansiedade e alcoolismo (Regier *et al.*, 1990; Marquenie *et al.*, 2007). Enquanto alguns estudos clínicos apontam para esta possível correlação, existe alguma evidência de que o abuso crônico de etanol precede os transtornos de ansiedade e não o contrário (Allan, 1995). A relação entre ansiedade e uso de álcool é complexa e

bidirecional. Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma alta comorbidade entre o uso abusivo de álcool e transtornos de ansiedade, mas estes estudos não conseguiram ainda apontar as conexões causais (Swendsen *et al.*, 1998; Grant *et al.*, 2004).

Diversos experimentos com roedores têm sido realizados no intuito de se entender melhor esta obscura relação entre ansiedade e alcoolismo. Alguns deles têm demonstrado uma correlação positiva entre a ansiedade experimental e o consumo de etanol, sugerindo assim uma ligação genética entre elas (Stewart *et al.*, 1993; Colombo *et al.*, 1995; Spanagel *et al.*, 1995; Izídio e Ramos, 2007; Chiavegatto *et al.*, 2008) enquanto outros não (Viglinskaya *et al.*, 1995; Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Henniger *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2004; 2005).

1.3 Ansiedade

A ansiedade é um estado emocional com componentes psicológicos e fisiológicos, que faz parte do espectro normal das experiências humanas, sendo propulsora do desempenho. Em geral, o termo “ansiedade” é considerado extremamente subjetivo e sujeito a múltiplas interpretações. Normalmente, ele está associado a outros termos também subjetivos, como “emocionalidade”, “estresse”, “aversividade” e “fobia”. Entretanto, muitos autores tendem a defini-la como sendo um conjunto de respostas fisiológicas (atividade do sistema nervoso autonômico, taquicardia, sudorese) e comportamentais (vigília e reatividade comportamental; esquiva) aumentadas que, juntas, protegem o indivíduo de um possível dano diante de uma situação potencialmente perigosa (File *et al.*, 1993; Lang *et al.*, 2000; Adamec *et al.*, 2001; Belzung e Griebal, 2001; Blanchard *et al.*, 2001; Dielenberg e McGregor, 2001; File, 2001). A ansiedade passa a ser patológica

quando é desproporcional à situação que a desencadeia, interferindo na qualidade de vida, conforto emocional ou no desempenho diário do indivíduo (Rosen e Schilkin, 1998). Sabe-se, que dentre as psicopatologias descritas em seres humanos, aquelas relacionadas à ansiedade podem ser consideradas as mais comuns, além de serem das mais importantes e estudadas. Apesar da ansiedade ser, a princípio, um fenômeno tipicamente humano, respostas fisiológicas e comportamentais semelhantes têm sido descritas em diversas espécies animais e parecem fazer parte de um mecanismo universal através do qual os organismos se adaptam a condições adversas (Gross e Hen, 2004).

1.4 Roedores na Pesquisa Biomédica

Atividades didáticas e de pesquisa científica utilizando animais são realizadas desde a antiguidade. O emprego de animais na investigação científica está associado a descobertas de grande impacto social, aumento da longevidade e bem-estar humanos. Para facilitar o estudo de doenças psiquiátricas ou comportamentais, modelos animais foram criados ao longo do tempo, devido às limitações experimentais apresentadas em estudos com seres humanos como, por exemplo, a falta de controle do ambiente e a dificuldade ou impossibilidade de manipulação e administração de tratamentos diversos. Dentre estes modelos, os roedores têm sido os animais mais utilizados em pesquisas, devido à sua facilidade de obtenção e manutenção, cruzamentos facilitados, gestações rápidas e progêneses numerosas.

Vários testes comportamentais com animais foram desenvolvidos para o estudo de diversas psicopatologias ligadas à emocionalidade, que são importantes na busca de características psicológicas animais semelhantes às apresentadas em seres humanos. Normalmente, estes testes expõem o animal, por uma quantidade de tempo variável, a um

ou vários estímulos aversivos, enquanto o observador faz a avaliação simultaneamente. Estes estímulos podem ser classificados como físicos (temperaturas extremas, choques elétricos, privação de comida) ou psicológicos, como ambientes inéditos, áreas fortemente iluminadas, espaços abertos, lugares altos, entre outros. (File, 1995; Ramos e Mormède, 1998).

1.4.1 Modelo genético Lewis e SHR

A influência de fatores genéticos no desenvolvimento de psicopatologias relacionadas ao alcoolismo (Walters, 2002; Oroszi e Goldman, 2004; McBride *et al.*, 2005; Rodd *et al.*, 2007) e à ansiedade (Ramos e Mormède, 1998; Ramos *et al.*, 1998; 1999; Henniger *et al.*, 2000; Tøye e Cox, 2001; Clément *et al.*, 2002) já foi amplamente demonstrada, tanto em humanos como em roedores. Como os roedores e os seres humanos possuem regiões cromossômicas sintênicas (seqüências genéticas semelhantes) (Gray *et al.*, 1999), qualquer estudo realizado em ratos pode ser comparado com regiões cromossômicas de seres humanos. Portanto, a identificação dos genes e dos produtos gênicos que afetam comportamentos ou fenótipos ligados à determinada característica em animais de laboratório, irá certamente aprimorar o entendimento dos mecanismos biológicos que controlam estas características em humanos.

Sabe-se, que diferentes linhagens de uma mesma espécie respondem, em geral, de maneira diferente aos mesmos estímulos estressantes (Ramos e Mormède, 1998). Assim, linhagens de roedores podem constituir uma importante ferramenta no estudo da genética do comportamento. No ano de 1997, a partir de um estudo com seis linhagens isogênicas de ratos, Ramos e colaboradores propuseram um novo modelo genético animal de ansiedade. Este era composto de duas linhagens de ratos, chamadas Lewis (LEW) e Spontaneously

Hipertensive Rats (SHR), que foram escolhidas por diferirem em comportamentos relacionados ao medo/emocionalidade, mas não em medidas gerais de locomoção. A linhagem LEW foi originada através de cruzamentos consangüíneos de ratos da linhagem Wistar, realizados pela Dra. Lewis (Stöhr, 1999; Mashimo *et al.*, 2006). Os ratos LEW apresentam uma baixa atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em resposta ao estresse (Calogero *et al.*, 1992; Sternberg *et al.*, 1992). Além disso, eles são considerados importantes no estudo do abuso de diferentes drogas, inclusive o etanol (Suzuki *et al.*, 1988). A linhagem SHR é composta de ratos que desenvolvem hipertensão arterial, tendo sido também obtida através de cruzamentos consangüíneos a partir da linhagem Wistar (Okamoto e Aoki, 1963). Sabe-se que os ratos SHR são mais sensíveis aos efeitos hipnóticos do etanol e também consomem maior quantidade deste líquido, quando comparados aos seus controles normotensos Wistar-Kyoto (WKY) (Khanna *et al.*, 1990). Os ratos SHR também têm sido considerados o modelo animal mais utilizado no mundo no estudo de comportamentos relacionados ao transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), por apresentarem características comportamentais que se assemelham aos aspectos fundamentais da doença (Sagvolden *et al.*, 2005). Os indivíduos afetados pelo TDAH apresentam sintomas típicos de desatenção, hiperatividade e impulsividade, além de serem considerados de risco para o consumo de substâncias psicoativas, incluindo o álcool (Biederman *et al.*, 1998; Ohlmeier *et al.*, 2008).

Quando comparados aos ratos LEW, os ratos SHR aproximam-se mais dos compartimentos aversivos de diferentes testes comportamentais, independentemente do sexo (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002; Chiavegatto *et al.*, 2008), sendo assim considerados os animais menos “ansiosos” neste modelo genético. As linhagens LEW e SHR também já foram comparadas diretamente em relação ao consumo de etanol. A relação entre os altos

níveis de ansiedade inata e a pré-disposição ao maior consumo de álcool não foi encontrada em estudos prévios. Pelo contrário, os ratos SHR (menos ansiosos) beberam mais álcool voluntariamente do que os ratos LEW (Da Silva *et al.*, 2004; 2005). No entanto, resultados opostos já foram identificados pelo nosso grupo (Chiavegatto *et al.*, 2008), sugerindo que mudanças de protocolo (ex. tipo de gaiola, concentrações utilizadas) podem afetar profundamente estes comportamentos. Como vemos, os ratos das linhagens isogênicas LEW e SHR diferem para uma série de aspectos comportamentais, incluindo a emocionalidade e o consumo de etanol.

Através de técnicas de mapeamento de QTL (Quantitative Trait Locus), Ramos e col. (1999) utilizando as linhagens LEW e SHR identificaram, pela primeira vez, *loci* que influenciam comportamentos emocionais em ratos. Um destes *loci*, denominado *Ofill* (open field inner locomotion 1), localizado no cromossomo 4 do rato, exerce uma forte influência sobre a locomoção na área central e aversiva do teste do campo aberto (CA). Recentemente, Vendruscolo e col. (2006) verificaram que esta mesma região afetou significativamente o consumo voluntário de álcool em ratos derivados de um intercruzamento entre as linhagens LEW e SHR. Assim, os resultados obtidos ao longo dos anos com estas duas linhagens, apontam para sua potencial utilidade no estudo da comorbidade entre alcoolismo e ansiedade, já que diferenças genéticas entre elas já foram descritas para ambos os tipos de comportamentos (Ramos *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2004; 2005; Izídio *et al.*, 2005; Vendruscolo *et al.*, 2006; Chiavegatto *et al.*, 2008).

Estas duas linhagens de ratos vêm sendo caracterizadas no nosso laboratório, não só quanto a aspectos comportamentais, mas também farmacológicos, moleculares e bioquímicos. Apesar disso, ainda existem dúvidas sobre o significado psicológico real das diferenças comportamentais entre as linhagens LEW e SHR. Por esta razão, é necessária

uma melhor caracterização destas linhagens nos mais variados aspectos, a fim de se elucidar vias bioquímicas, mecanismos biológicos ou genes que estejam contribuindo para a expressão deste comportamento diferenciado entre elas.

1.5 Fatores ambientais

Ao longo das últimas décadas, os testes comportamentais realizados em múltiplas linhagens de roedores tornaram-se um passo chave das pesquisas na área das neurociências, particularmente no campo da genética do comportamento. A habilidade de identificar e manipular genes que influenciam certas características comportamentais tem sido considerada de extrema importância, permitindo o desenvolvimento de populações de animais através de cruzamentos entre irmãos (linhagens isogênicas), seleção genética, transgenia ou manipulações de genes alvo (*knockout*, *knockin*). Entretanto, os resultados obtidos nos estudos desta área têm sido criticados pela falta de reprodutibilidade (Chesler *et al.*, 2002; Van der Staay e Steckler, 2002; Würbel, 2002). Esta falta de consistência nos resultados entre experimentos utilizando modelos genéticos animais comprovam a importância e a influência dos fatores ambientais. Estudos recentes têm mostrado que as condições ambientais de distintos laboratórios têm um efeito robusto nos perfis comportamentais dos animais (Crabbe *et al.*, 1999; Chesler *et al.*, 2002; Izídio *et al.*, 2005; Wahlsten *et al.*, 2006). Além disso, mesmo em situações onde foram despendidos grandes esforços para padronizar o ambiente de laboratório ou a situação de teste, não foi possível garantir uma consistência dos resultados comportamentais entre diferentes laboratórios, e efeitos específicos de cada local foram observados (Crabbe *et al.*, 1999). Tendo em vista que fatores ambientais podem interagir com genes relevantes para a característica em

estudo, a falta de atenção às condições ambientais pode comprometer a confiabilidade dos resultados, mascarando possíveis efeitos genéticos.

Para podermos generalizar um resultado, é necessário acreditar que ele não apareceu devido a determinadas condições ambientais restritas a um laboratório. A falta de padronização de variáveis importantes pode impedir a reprodução de resultados. O principal desafio, entretanto, é determinar quais fatores precisam ser regulados e padronizados. Identificar e descrever fatores ambientais que são potencialmente relevantes para um grande número de estudos e laboratórios torna-se, assim, extremamente importante. Este conhecimento contribuirá para uma melhoria na consistência dos resultados, na interpretação de diferenças genéticas e no aprimoramento dos testes comportamentais.

Diversas variáveis biológicas e ambientais têm conhecida influência nos resultados dos testes comportamentais. Elas são, portanto, equalizadas ou ao menos descritas/listadas na maioria das publicações. Entre elas, nós poderíamos mencionar: idade (Imhof *et al.*, 1993), sexo (Imhof *et al.*, 1993), horário do teste (Gentsch *et al.*, 1982), nível de iluminação (Cardenas *et al.*, 2001), superfície do aparato (Morato e Castrechini, 1989), experiência prévia no aparato (Treit *et al.*, 1993; Bertoglio e Carobrez, 2000) e agrupamento nas gaiolas (Maisonnette *et al.*, 1993). Outros fatores, contudo, apesar de serem potencialmente relevantes, raramente ou nunca são investigados.

1.6 Correlações inter-testes

A avaliação da correlação de comportamentos animais relacionados com uma ou várias psicopatologias exige muitas vezes que o pesquisador submeta o animal a uma bateria de testes. A utilização destas baterias para avaliar o perfil comportamental do

animal é defendida pela evidência de que, mesmo em testes que medem características aparentemente similares (ex. testes de ansiedade que se baseiam no conflito natural entre explorar um ambiente novo e a tendência de evitar áreas potencialmente perigosas), existem diferenças qualitativas entre os testes, e, apesar de haver uma sobreposição entre eles, cada um mede dimensões distintas do comportamento. Há um número crescente de evidências sugerindo que diferentes testes podem acessar diferentes tipos de emocionalidade em roedores (para revisão ver Ramos e Mormede, 1998; Ramos *et al.*, 2008). Além disso, ao contrário de outros fenótipos mais estáveis, a emocionalidade não apresenta um padrão constante ao longo do tempo, podendo flutuar de maneira imprevisível (Ramos, 2008). Sendo assim, as diferenças entre os testes podem estar diminuídas ou realçadas devido ao estado emocional do animal naquele determinado momento. Ao fazermos uma bateria de testes, portanto, contamos com este fator incontrollável que é o “estado emocional momentâneo do animal”, que pode ser ainda mais pronunciado se não nos atentarmos à importância das condições ambientais.

De posse dos resultados de uma bateria de testes comportamentais o pesquisador possui ferramentas estatísticas que permitem avaliar a correlação entre diferentes comportamentos. Uma destas análises é chamada de análise de correlação. Basicamente, nesta análise, é realizada uma estimativa da correlação entre as variáveis selecionadas que são expressas por um coeficiente (r), que varia de -1 a +1. Este coeficiente, elevado ao quadrado, produz um índice (r^2) usado para estimar a intensidade da correlação, determinando a porcentagem da variação em uma medida que está associada com a variação na outra medida, e vice-versa. Para fazer esta análise, entretanto, é necessário que todos os animais tenham passado pelas mesmas experiências e que as condições ambientais tenham se mantido constantes durante toda a bateria de testes. Levando-se em conta este

ponto, acreditamos ser imprescindível que, para estudos de correlação onde se visa estabelecer a possível associação entre “perfis comportamentais de risco” e o consumo de etanol, os animais estejam sob as mesmas condições de alojamento durante todo o experimento.

Sabe-se que o isolamento de um animal do seu grupo social para análises experimentais é uma situação freqüentemente utilizada por pesquisadores de diversas instituições. Esta prática é necessária para experimentos de consumo e preferência de etanol, onde se necessita medir o consumo diário de cada animal individualmente. Geralmente, as análises de matriz que correlacionam testes comportamentais com consumo de etanol são feitas sem levar em conta esta ou outra condição de alojamento (Overstreet *et al.*, 1999; Rezvani *et al.*, 2002).

1.7 Hipótese

Como vemos, os ratos das linhagens isogênicas LEW e SHR diferem para uma série de aspectos comportamentais, incluindo a emocionalidade e o consumo de etanol. Portanto, estas duas linhagens parecem ser úteis para o estudo de diferentes psicopatologias que podem, eventualmente, estar associadas. O estudo detalhado destes animais, envolvendo uma ampla caracterização comportamental, poderá fornecer pistas a respeito de quais fatores fisiológicos e psicológicos estão envolvidos na etiologia da ansiedade e do alcoolismo, por exemplo.

Desta maneira, nós utilizamos as linhagens LEW e SHR em uma bateria de testes comportamentais para avaliar alguns fatores comportamentais e farmacológicos que podem estar envolvidos com o controle do consumo de etanol. Os dados foram utilizados para a elaboração de uma matriz de correlação, permitindo uma melhor compreensão acerca do

significado de cada teste e das relações inter-testes. Assim, esperamos testar as seguintes hipóteses: a) existe uma correlação positiva entre os níveis de ansiedade inata e o consumo de etanol em nossas linhagens de ratos; b) comportamentos relacionados à impulsividade e à busca por novidade predispõem a um alto consumo de etanol nestas linhagens; c) a diferença entre as linhagens LEW e SHR em relação ao consumo de etanol se deve, em parte, a uma sensibilidade diferenciada aos efeitos do etanol e d) existem diferenças sexuais importantes na relação entre os diferentes testes comportamentais. Esperamos, ainda, consolidar as linhagens de ratos LEW e SHR como modelo genético para o estudo do alcoolismo e seus fatores ambientais de predisposição. Este estudo original poderá contribuir com novas informações em relação aos processos psicológicos e fisiológicos envolvidos no alcoolismo e contribuir para novas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento deste transtorno psiquiátrico.

2. Objetivos

2.1 Geral

Nosso objetivo neste estudo foi avaliar se comportamentos relacionados à ansiedade, busca pela novidade, impulsividade e hiperatividade poderiam estar relacionados com o consumo de etanol. Para isso, tentamos responder às seguintes perguntas: em um modelo animal de alcoolismo, os animais mais predispostos ao consumo de etanol poderiam ser considerados como mais “ansiosos” e/ou mais “impulsivos” e/ou mais “atraídos pela novidade”? Teriam eles um metabolismo ou uma sensibilidade diferente para o álcool? Além disso, o presente trabalho teve por finalidade avaliar o papel

do ambiente de alojamento nas diferenças comportamentais observadas entre as linhagens LEW e SHR.

2.2 Específicos

Testar as linhagens LEW e SHR em diversos testes de comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade, à busca pela novidade e à impulsividade, já que tais fatores poderiam constituir fatores de suscetibilidade ao alcoolismo.

Elaborar uma matriz de correlação com algumas variáveis dos testes comportamentais feitos sob a mesma condição ambiental (alojamento), a fim de verificar as possíveis correlações existentes e contribuir para uma melhor compreensão acerca do significado de cada teste e das relações inter-testes.

Comparar o perfil comportamental das linhagens LEW e SHR em condição normal de agrupamento (4 animais por caixa) ou de isolamento social (1 animal por caixa).

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

As colônias de ratos LEW e SHR usadas neste estudo foram mantidas no biotério do Laboratório de Genética do Comportamento (LGC) sob um sistema de acasalamento irmão/irmã, como recomendado para todas as linhagens isogênicas. Os animais foram desmamados e separados por sexo com quatro semanas de idade e, após isso, mantidos em gaiolas de plástico coletivas (5 ratos/gaiola), exceto no período de isolamento, onde foram mantidos em gaiolas individuais a partir de 8-9 semanas de idade. As gaiolas eram forradas

com serragem esterilizada (trocada a cada dois dias) e os animais eram testados a partir de, no mínimo, 8 semanas de idade. Todos os animais foram mantidos em condições padronizadas (temperatura de 22 ± 2 °C; ciclo claro/escuro de 12 h, luz das 07:00 as 19:00 h) com comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados cuidadosamente de acordo com as normas previstas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC, Protocolo PP00046).

3.2 Desenho Experimental

No primeiro bloco experimental, um total de 44 animais LEW e SHR de ambos os sexos foram utilizados, 11/linhagem/sexo. Entre 8 e 9 semanas de idade, todos os animais foram separados em gaiolas individuais e passaram por todos os testes comportamentais. Os animais foram submetidos a dois testes de ansiedade (campo aberto e labirinto em cruz elevado); um de busca pela novidade; um de impulsividade; um protocolo de auto-administração que envolvia sacarina, quinino, etanol e água e um teste farmacológico envolvendo a sensibilização aos efeitos do etanol. A seqüência dos testes comportamentais que foram realizados está sumarizada na Figura 1.

No segundo bloco experimental foram utilizados, ao total, 64 animais de ambos os sexos das linhagens de ratos LEW e SHR. Estes animais foram divididos em dois grupos experimentais referentes a dois tratamentos, isolados socialmente ou agrupados, com 8 animais/linhagem/sexo/tratamento. Entre 8 e 9 semanas de idade, metade dos animais foi separada em gaiolas individuais, enquanto que a outra metade continuou vivendo em gaiolas coletivas, com 4 animais por gaiola. Os animais foram então submetidos a um teste de busca pela novidade e dois testes de ansiedade (campo aberto e labirinto em cruz elevado). Na Figura 2 encontra-se o desenho experimental do segundo bloco experimental.

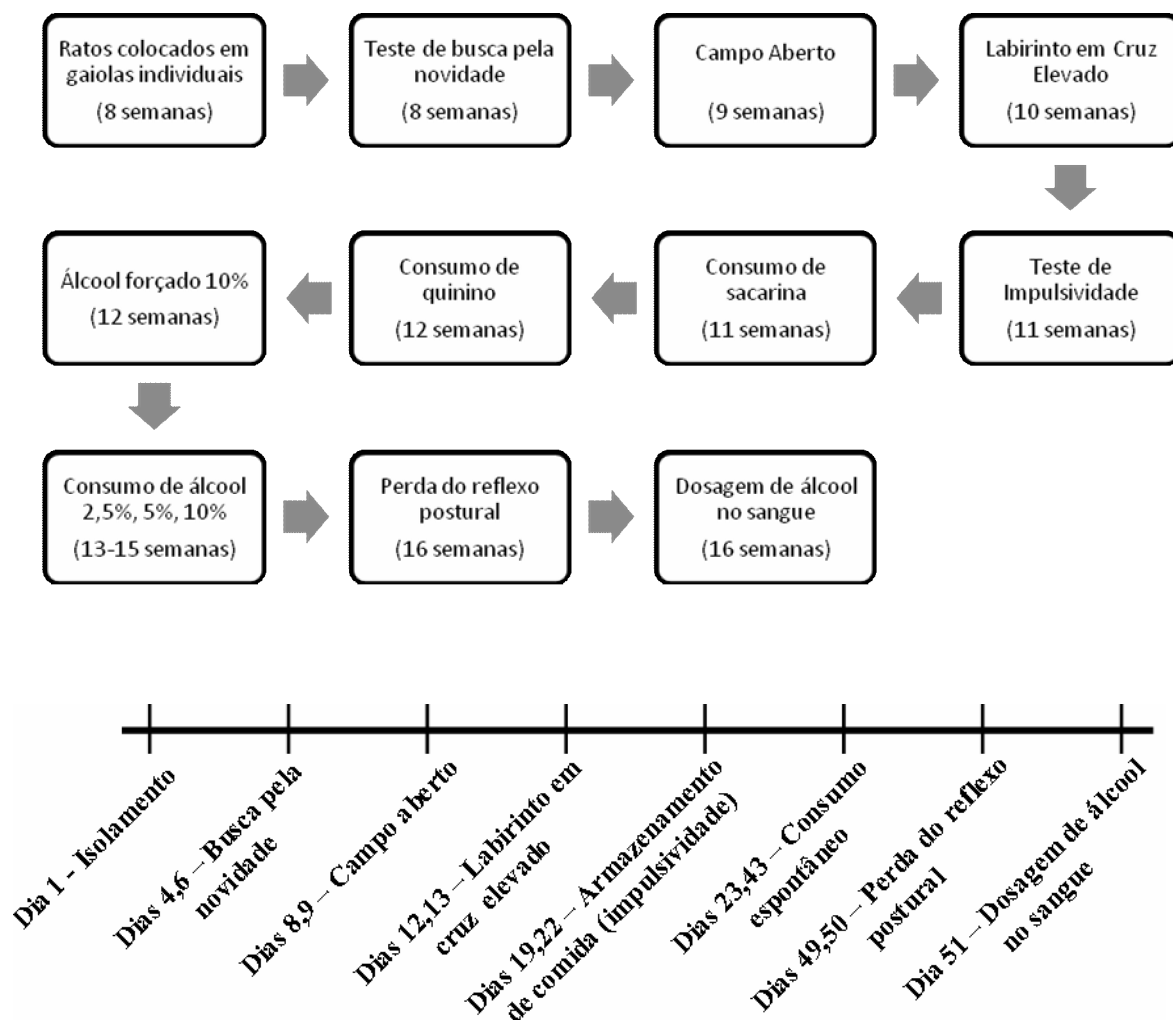


Figura 1 – Sequência dos testes comportamentais realizados no primeiro bloco experimental e idade aproximada dos animais em cada etapa (N=11/linhagem/sexo).

3.3 Testes Comportamentais

3.3.1 Preferência de Lugar (teste de busca pela novidade)

A busca pela novidade tem sido definida como um traço comportamental característico de roedores (Laviola e Adriani, 1998). Neste sentido, o teste de preferência de lugar (PL) é um dos testes de busca pela novidade mais utilizados. O objetivo deste teste é

avaliar os níveis de “neofobia” ou “neofilia”, através da preferência (ou aversão) de lugar, definidos pela comparação entre o tempo gasto pelos animais no compartimento previamente conhecido e no ambiente totalmente desconhecido. Este teste foi realizado em um aparato que consiste em uma caixa retangular de madeira coberta com fórmica dividida em dois compartimentos de 30 a x 30 c x 22 l cm, um branco com listras verticais pretas e outro totalmente preto. Os dois compartimentos são conectados por um corredor central de 10 cm de largura e 14 cm de comprimento na cor cinza, que contém uma porta móvel (7 x 7 cm) de cada lado, capaz de fechar esta comunicação entre os dois lados quando necessário. A luminosidade utilizada no teste foi de 7 lux. Este teste foi dividido em duas partes, habituação e avaliação comportamental. Durante o período de habituação, cada rato foi confinado em um dos dois compartimentos durante dois dias seguidos, por um período de 30 minutos. No terceiro dia, o rato foi colocado no corredor central do aparato (até então sem acesso a nenhum dos dois compartimentos) e as portas foram removidas. O tempo gasto em cada compartimento, “novo” ou “familiar”, foi registrado, sendo que somente considerou-se um animal dentro de um compartimento quando ali esteve com as 4 patas. O teste de cada animal teve uma duração de 15 minutos e todos eles foram filmados por uma câmera de vídeo posicionada acima dos aparelhos, monitorados em sala adjacente via circuito fechado de TV-câmera e gravados em fitas VHS. Após cada animal ser testado, o aparato foi limpo com esponja embebida em álcool 10% e seco com papel toalha. Os métodos de limpeza e gravação foram os mesmos para todos os outros testes de ansiedade utilizados neste estudo.

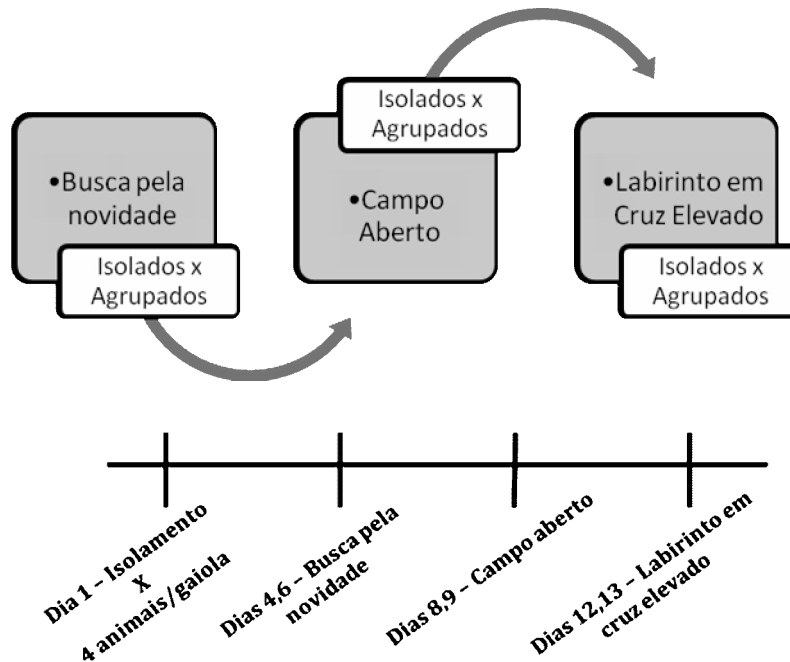


Figura 2 – Seqüência dos testes comportamentais realizados no segundo bloco experimental (N=8/linhagem/sexo/tratamento).

3.3.2 Campo Aberto (teste de ansiedade/emocionalidade)

O teste do campo aberto (CA), que é o teste de emocionalidade mais utilizado no mundo, foi desenvolvido em 1934 por Calvin Hall. O aparelho é feito de madeira coberta com fórmica impermeável branca com o chão branco de 100 X 100 cm (dividida por linhas pretas em 25 quadrados de 20 x 20 cm) e paredes brancas (40 cm de altura). A iluminação no centro do campo aberto utilizada foi de 7 lux. Cada rato foi colocado no centro do campo aberto e o número de cruzamentos periféricos, adjacentes à parede (locomção periférica), número de cruzamentos centrais, distantes das paredes (locomção central), atravessados com todas as quatro patas, tempo gasto no centro do aparato e número total de bolos fecais (defecação) foram registrados por 5 minutos. Neste teste os animais com

menos medo (“menos ansiosos/emocionais”) permanecem mais tempo e fazem mais cruzamentos na área central.

3.3.3 Labirinto em Cruz Elevado (teste de ansiedade/emocionalidade)

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos testes mais utilizados na psicofarmacologia para a identificação seletiva do efeito de drogas ansiolíticas e ansiogênicas (Pellow *et al.*, 1985). Este modelo experimental baseia-se no conflito entre a tendência inata à exploração de um ambiente novo e a aversão a lugares altos e desprotegidos (File, 1995). O aparato, o qual é inteiramente preto, apresenta quatro braços, sendo dois fechados e dois abertos, distantes 52 cm do chão. Os dois braços fechados são opostos, medindo 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, com paredes de 40 cm de altura. Os braços fechados formam uma cruz com os braços abertos, os quais medem 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, sendo margeados por um anteparo de 0,5 cm de altura (para evitar a queda dos animais). Na interseção entre os braços fechados e abertos há uma plataforma central medindo 13,5 x 10 cm. Cada rato foi colocado na plataforma central com a face voltada para um braço aberto e, em seguida, os seguintes comportamentos foram registrados por 5 minutos: número de entradas e tempo gasto (com as quatro patas) dentro de cada tipo de braço. A plataforma central esteve sob iluminação de 7 lux. O animal considerado como mais “ansioso” é aquele que vai menos e permanece por menos tempo nos braços abertos do aparato (Ramos e Mormède, 1998).

3.3.4 Armazenamento de Comida (teste de impulsividade)

O teste de armazenamento de comida (AC) foi desenvolvido como um modelo animal de impulsividade, baseado no fato de que a abundância de alimento, sob condições

apropriadas, deveria promover duas repostas comportamentais naturais no animal: primeiro ele iria se alimentar e, depois de saciado, iria estocar o alimento remanescente para uso futuro. Um déficit no comportamento de estocar alimento pode ser considerado como um sinal de aumento da impulsividade (ver Johansson *et al.*, 1999 para maiores detalhes). Este teste foi realizado em uma arena de 100 x 100 cm dividida em quatro quadrantes de 50 x 50 cm e com paredes de 40 cm de altura. Deste modo, quatro animais puderam ser testados simultaneamente. Fixado à parede de cada quadrante encontrava-se um abrigo de plástico de 26 x 23 x 23 cm, que continha uma porta removível. A luminosidade utilizada foi ajustada em 7 lux. Dois dias antes do teste, o consumo basal de ração (quantidade ingerida em um dia por cada rato, em gramas) foi registrado. Posteriormente, os animais foram habituados um dia antes do teste, podendo circular livremente por todo o aparato durante 60 minutos. Após o período de habituação, todos eles foram privados de comida por um período de 24 horas. No dia do teste, 10 pedaços de ração previamente pesados foram colocados no chão na extremidade oposta à entrada do abrigo. Logo após, os animais foram colocados no abrigo, sem acesso para a área aberta, permanecendo por 15 minutos lá dentro. Após este tempo, foi liberado o acesso à área aberta contendo os pedaços de ração e os animais puderam explorar todo o aparato por um período de 30 minutos. Foram observadas as seguintes medidas: quantos pedaços e quantos gramas de ração foram deixados (1) dentro do abrigo; (2) fora do abrigo, sendo que a diferença entre os pesos inicial e final de ração permitiu estimar o consumo de comida durante o teste. A idéia do teste é que os animais mais impulsivos deveriam armazenar menos ou não armazenar dentro do abrigo o alimento colocado no aparato (Johansson *et al.*, 1999).

3.3.5 Consumo Espontâneo de Sacarina, Quinino e Etanol

O objetivo deste protocolo é avaliar o consumo de etanol bem como de seus controles gustativos para melhor compreender os fatores comportamentais ligados ao consumo destas substâncias (adaptado de Spanagel *et al.*, 1995). Para isso, as caixas em que os animais estavam sendo mantidos permitiam que eles tivessem movimentos livres e acesso *ad libitum* à ração e a uma ou duas garrafas de líquido, conforme o protocolo. O protocolo de consumo espontâneo consistiu de: dois dias de livre-escolha entre sacarina (7,5 mM) e água; dois dias de livre-escolha entre quinino (2μM) e água; dois dias de etanol forçado (10%) e livre-escolha entre etanol (2,5, 5,0 ou 10%) e água (2 dias para cada concentração com soluções v/v). O consumo foi medido diariamente (sacarina, quinino e água) ou a cada dois dias (etanol e água), sempre a partir das 15:00h, através da pesagem das garrafas. No período da pesagem os animais permaneceram sem qualquer tipo de líquido para consumo. A cada dia as garrafinhas foram cuidadosamente trocadas de lado para evitar qualquer tipo de efeito da posição. O peso dos animais foi medido uma vez por semana, a partir do primeiro dia de sacarina até o final do experimento.

3.3.6 Perda do Reflexo Postural

Neste teste (PRP) os ratos LEW e SHR de ambos os sexos receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de álcool (20 %, p/v) na dose de 3,5 g/kg e foram posicionados com o dorso apoiado em uma plataforma na forma de V. O tempo entre a injeção e a perda do reflexo postural foi registrado, bem como a latência para a recuperação deste reflexo. A perda do reflexo postural foi considerada quando o animal perdia completamente o reflexo de endireitamento, ou seja, quando ele era colocado dorsalmente na plataforma em V e não

conseguia retornar a posição normal. A recuperação do reflexo foi estipulada quando o animal, após virar-se pela primeira vez espontaneamente e ser colocado com o dorso apoiado na plataforma pelo experimentador novamente, conseguia se virar por 3 vezes consecutivas em um intervalo máximo de 1 minuto.

3.3.7 Dosagem de Álcool no Sangue

Imediatamente após a recuperação do reflexo postural, uma amostra de 50 μ L de sangue foi retirada de cada animal, através de uma pequena incisão na porção final da cauda. O sangue coletado foi armazenado em tubos plásticos do tipo *ependorf* contendo 1 ml de solução de ácido perclórico (3%). Posteriormente, o homogeneizado de ácido perclórico e sangue foi misturado a uma solução contendo tampão Tris (0,5 molar pH 8,8) e as enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e álcool desidrogenase (AD). O conteúdo de sangue em cada amostra foi, então, analisado no espectrofotômetro 340WL. A quantidade de etanol no sangue dos animais foi calculada pelo método de regressão linear baseado nos valores obtidos a partir de soluções padrão.

3.4 Análise Estatística

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média, sendo o N experimental nos testes comportamentais do primeiro bloco de onze e do segundo bloco de oito animais por linhagem/sexo. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias para os fatores linhagem e sexo, ou três vias (linhagem, sexo e tratamento), com ou sem medidas repetidas, dependendo do protocolo experimental. Caso tenham ocorrido interações entre estes

fatores, foi aplicado o teste de comparação de médias (*post hoc*) Newman-Keuls. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

Em relação aos dados do primeiro bloco experimental, foi elaborada uma matriz de correlação com algumas variáveis medidas (1-3 por teste comportamental), separadamente para cada sexo. Nesta matriz, a correlação entre as variáveis é expressa por um coeficiente (r) que pode variar de -1 a +1, e que, se elevado ao quadrado, produz um índice chamado r^2 . Este último pode ser usado para estimar a intensidade da correlação, determinando a porcentagem da variação em uma medida que está associada com (ou é explicada por) a variação na outra medida, e vice-versa. Todos os resultados foram avaliados através do software *STATISTICA* (Statsoft, Tulsa, USA, 1998).

4. Resultados

4.1 Primeiro bloco experimental

4.1.1 Preferência de Lugar

As análises de variância (ANOVA) revelaram que, para o tempo gasto no compartimento familiar (Figura 3), houve um efeito significativo do fator linhagem [SHR > LEW; $F(1,40) = 4,8$ e $p < 0,05$]. Já para o tempo passado no compartimento novo, não ocorreu nenhum efeito significativo.

4.1.2 Campo Aberto

Os resultados do CA estão sumarizados na Figura 4. As análises de variância demonstraram que, para a medida locomoção central, foi observado um efeito significativo de linhagem [SHR > LEW; $F(1,40) = 16,9$ e $p < 0,001$] e sexo [F > M; $F(1,40) = 12,9$ e $p < 0,001$] (Figura 4a). Já para a variável locomoção periférica, foi observada uma interação

entre linhagem e sexo [$F(1,40)= 4,53$ e $p<0,05$], com os machos LEW, mas não as fêmeas, apresentando um maior índice de locomoção periférica em relação aos animais SHR (Figura 4b). O mesmo efeito de interação foi observado na variável defecação [$F(1,40)= 7,28$ e $p<0,05$], com os machos LEW apresentando maior defecação que os SHR (dados não mostrados). Com relação ao tempo no centro do aparato, ocorreu um efeito linhagem [SHR > LEW; $F(1,40)= 38,6$ e $p<0,001$] (dados não mostrados). Em todos os casos, os ratos SHR aproximaram-se mais do ambiente aversivo do campo aberto (área central) que os ratos LEW, sendo assim considerados os animais menos “ansiosos”.

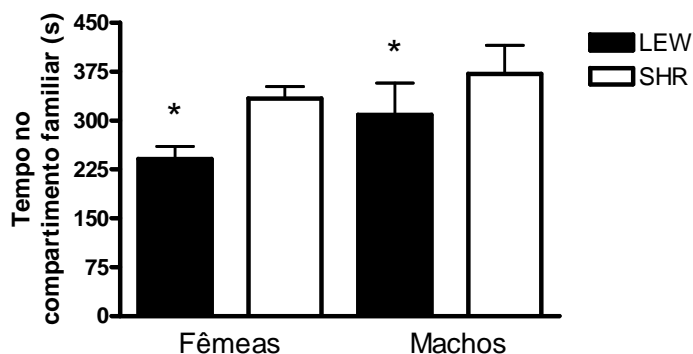


Figura 3 – Tempo gasto no compartimento familiar para ratos LEW e SHR de ambos os sexos. As barras representam os valores médios \pm erro padrão. * representa efeito geral de linhagem (ANOVA, $p<0,05$).

4.1.3 Labirinto em Cruz Elevado

Os resultados obtidos no LCE são mostrados nas Figuras 5 e 6. Para a variável tempo nos braços abertos, ocorreu um efeito significativo apenas para o fator sexo [$F > M$; $F(1,39)= 5,2$ e $p<0,05$] (Figura 5a). Para a variável tempo nos braços fechados (Figura 5b), ocorreram efeitos significativos gerais para os fatores linhagem e sexo [LEW > SHR; $F(1,39)= 4,6$ e $p<0,05$ e $F < M$; $F(1,39)= 19,8$ e $p<0,001$]. Quanto ao número de entradas nos braços fechados, ocorreu efeito significativo para o fator linhagem [LEW > SHR;

$F(1,39)= 15,4$ e $p<0,001$] (Figura 6a). Para o número de entradas nos braços abertos, ocorreu efeito significativo para os fatores linhagem [LEW > SHR; $F(1,39)= 9,8$ e $p<0,01$] e sexo [$F > M$; $F(1,39)= 6,7$ e $p<0,05$] (Figura 6b).

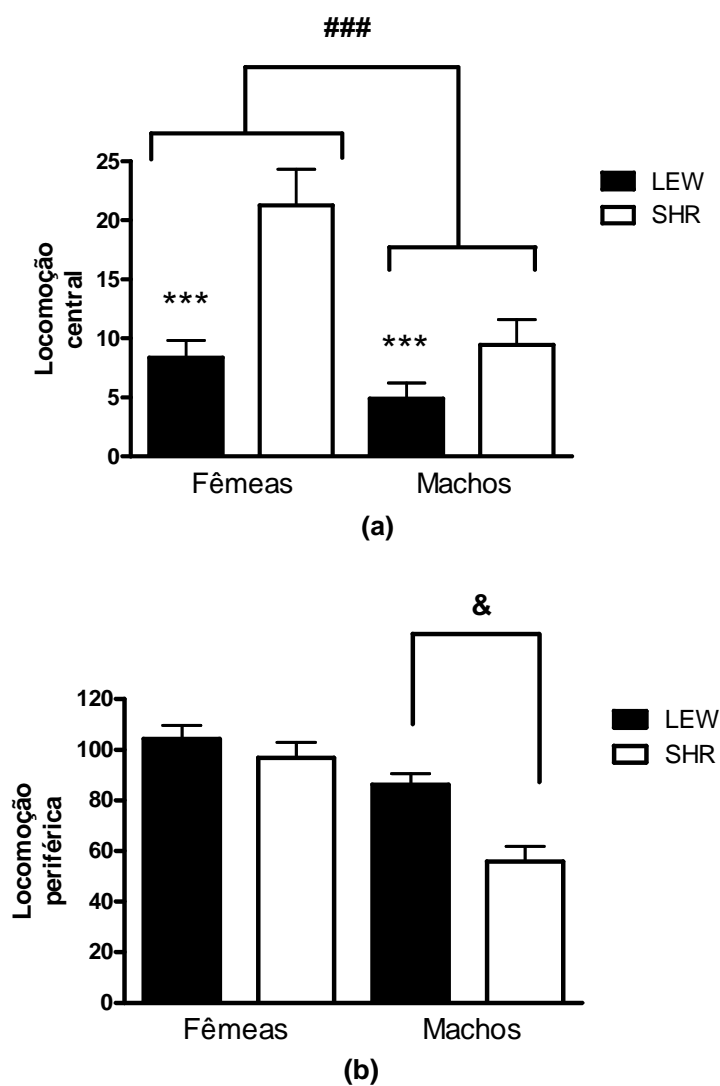


Figura 4 – Locomoção central (a) e periférica (b) no campo aberto, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos. As barras representam os valores médios \pm erro padrão. *** e ### representam, respectivamente, efeitos significativos de linhagem e de sexo (ANOVA, $p<0,001$). & representa diferenças entre machos LEW e SHR segundo o teste post hoc Newman-Kells ($p<0,05$).

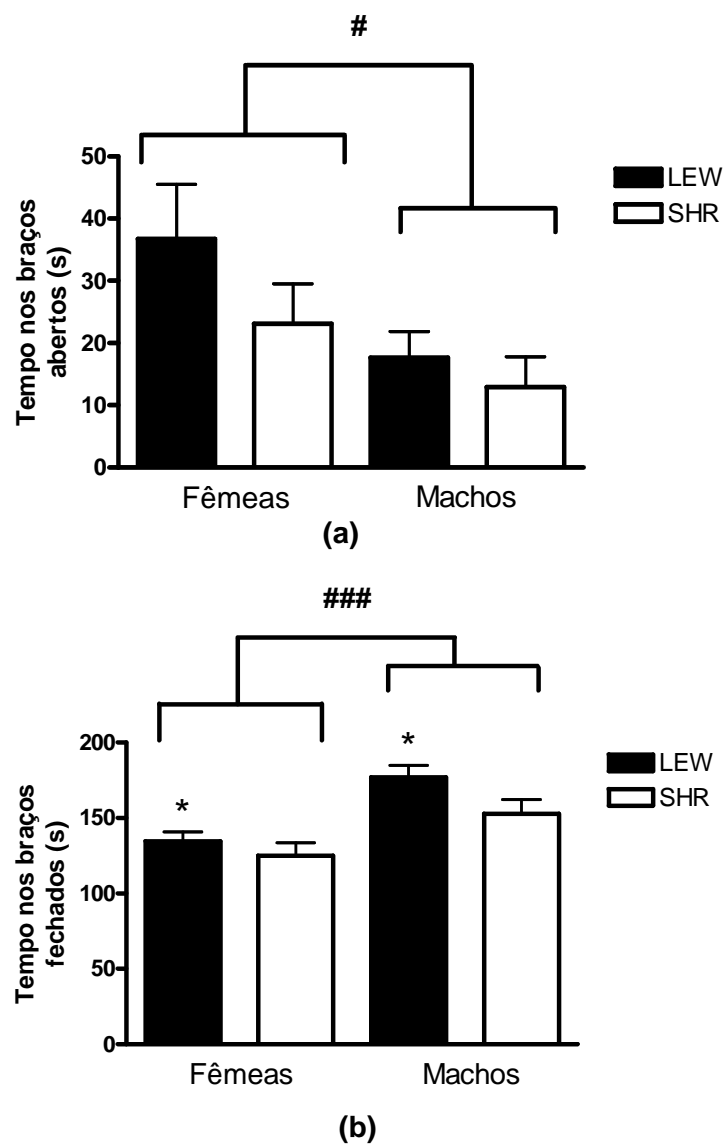


Figura 5 – Tempo nos braços abertos (a) e fechados (b) do labirinto em cruz elevado, para os ratos LEW e SHR de ambos os sexos. As barras representam os valores médios \pm erro padrão. # e ### representam efeito geral do fator sexo (ANOVA, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). * representa efeito linhagem (ANOVA, $p < 0,05$).

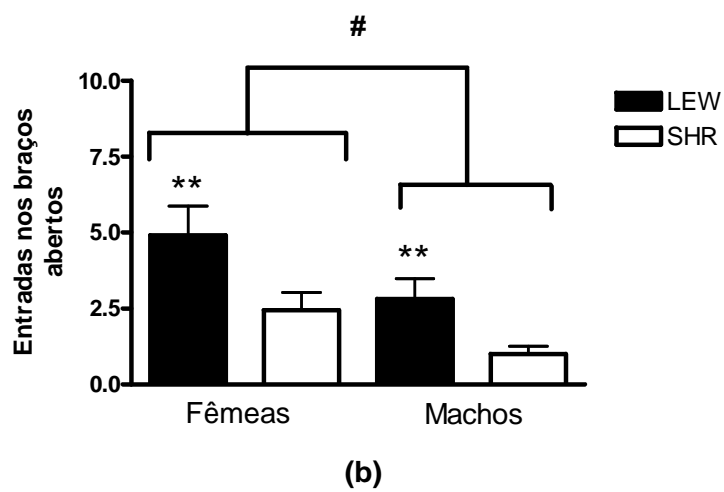
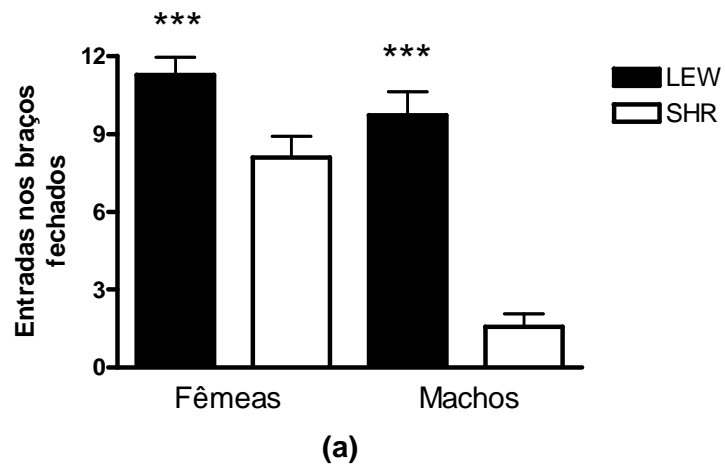


Figura 6 – Número de entradas nos braços fechados (a) e abertos (b) do labirinto em cruz elevado, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos. *** e ** representam efeito linhagem (ANOVA, $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). # representa efeito sexo (ANOVA, $p < 0,05$).

4.1.4 Teste de Impulsividade (Armazenamento de comida)

As análises de variância revelaram os seguintes resultados: para o consumo basal de ração (medido dois dias antes do teste), ocorreu efeito significativo dos fatores linhagem e sexo, sendo a linhagem SHR > LEW [$F(1,39)= 25,1$ e $p<0,001$] e o sexo M > F [$F(1,39)= 63,7$ e $p<0,001$], como pode ser observado na Figura 7a. Com relação ao consumo de ração durante o teste (Figura 7b), foi observado novamente um efeito significativo dos fatores linhagem e sexo [SHR > LEW; $F(1,39)= 4,0$ e $p<0,05$ e M > F; $F(1,39)= 6,1$ e $p<0,05$]. Para o número de pellets dentro/fora do abrigo (dados não mostrados), ocorreu um efeito significativo para o fator linhagem, sendo que na medida dentro do abrigo tivemos SHR > LEW [$F(1,39)= 4,7$ e $p<0,05$], enquanto que fora do abrigo, tivemos LEW > SHR [$F(1,39)= 4,7$ e $p<0,05$]. Finalmente, para o peso final de ração dentro/fora do abrigo, também foi encontrado um efeito significativo para o fator linhagem, com a linhagem SHR armazenando maior quantidade de ração dentro do abrigo que a linhagem LEW [$F(1,39)= 4,6$ e $p<0,05$] e vice-versa [$F(1,39)= 4,6$ e $p<0,05$] (Figura 8).

4.1.5 Consumo Espontâneo

Os resultados obtidos nos testes de consumo espontâneo estão dispostos nas Figuras 9–11. Para o consumo basal de água, ocorreram efeitos significativos para os fatores linhagem [SHR > LEW; $F(1,39)= 125,0$ e $p<0,001$] e sexo [M > F; $F(1,39)= 81,1$ e $p<0,001$] (dados não mostrados). Com relação ao consumo espontâneo de sacarina, houve uma interação sexo x linhagem [$F(1,39)= 6,51$ e $p<0,05$], com ratos da linhagem SHR bebendo quantidades significativamente maiores de sacarina do que ratos LEW em ambos os sexos [$F(1,39)= 163,5$ e $p<0,001$] e a diferença intersexual (F>M) ocorrendo somente na linhagem SHR (Figura 9a). Para o consumo de quinino em livre escolha (Figura 9b), foram

observados efeitos significativos para os fatores linhagem e sexo [SHR > LEW; $F(1,36)=11,3$ e $p<0,01$ e $M > F$; $F(1,36)=7,0$ e $p<0,05$]. Na variável consumo de álcool forçado (Figura 10), foi encontrado um efeito significativo para o fator linhagem [SHR > LEW; $F(1,39)=4,2$ e $p<0,05$]. Com relação ao consumo espontâneo de etanol, nas fêmeas foram evidenciadas diferenças significativas para o fator linhagem, com ratas da linhagem SHR consumindo maiores quantidades de álcool do que as LEW [$F(3,105)=6,8$ e $p<0,05$], e para o fator concentração [$F(3,105)=22,8$ e $p<0,001$], com um aumento do consumo de acordo com a concentração de álcool (Figura 11a). Já para os machos, nenhuma diferença significativa entre ratos LEW e SHR foi observada no consumo de etanol a 2,5%, 5% e 10% em livre escolha, ocorrendo somente uma interação linhagem x concentração [$F(3,105)=5,0$ e $p<0,05$], com os ratos da linhagem SHR consumindo maiores quantidades de etanol na concentração mais alta (10%) do que a 2,5 e 5% (Figura 11b). Na medida % de preferência ao etanol (dados não mostrados) a ANOVA também revelou que nas fêmeas ocorreram diferenças significativas para o fator linhagem [SHR>LEW; $F(3,105)=6,8$ e $p<0,05$]. Em machos, foi encontrada novamente uma interação entre linhagem e concentração [$F(3,105)=3,7$ e $p<0,05$], com os ratos da linhagem LEW mostrando maior preferência pelo etanol na concentração de 2,5% do que a 10%.

4.1.6 Perda e Recuperação do Reflexo Postural

Ocorreu um efeito significativo do fator sexo [$M > F$; $F(1,38)=32,9$ e $p<0,001$] sobre o tempo para a recuperação do reflexo, como pode ser observado na Figura 12. Uma interação quase significativa ($p=0,06$) foi encontrada, sugerindo que os machos SHR, porém não as fêmeas, tendem a levar mais tempo para acordar do que os machos LEW.

Não foram encontradas diferenças significativas com relação ao tempo entre a injeção e a perda do reflexo postural (Figura 12a).

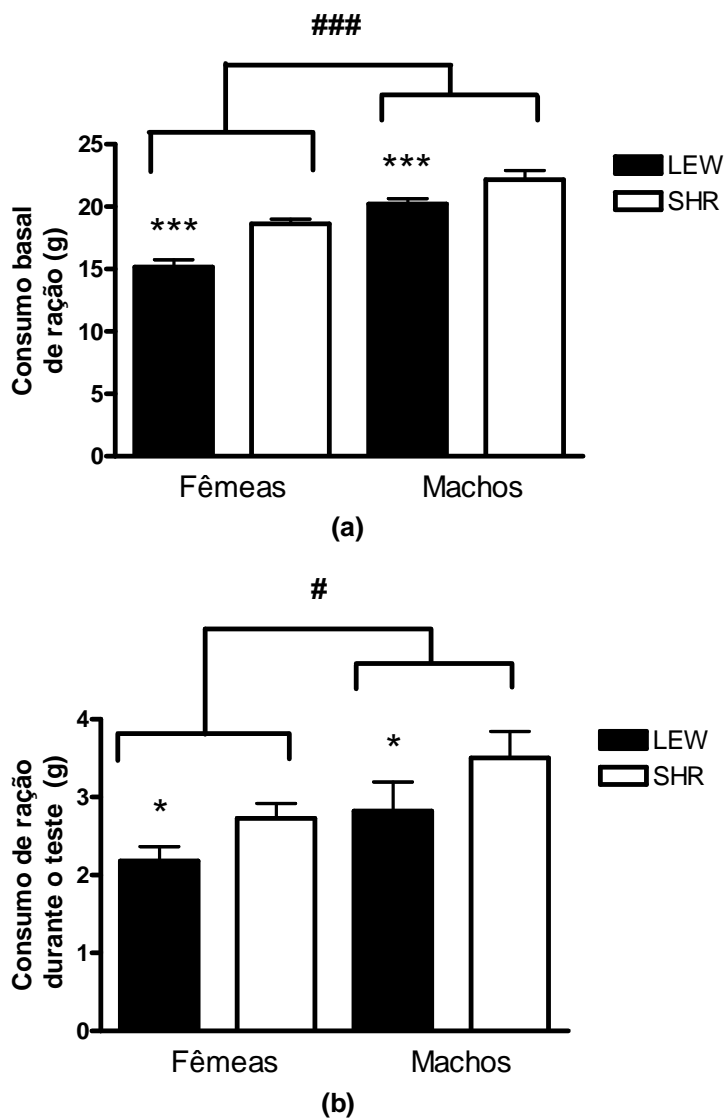


Figura 7 – Consumo de ração basal (a) e durante o teste de impulsividade (b) para ratos LEW e SHR de ambos os sexos. As barras representam os valores médios \pm erro padrão. # e ### representam efeito geral do fator sexo (ANOVA, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). * e *** representam efeito linhagem (ANOVA, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente).

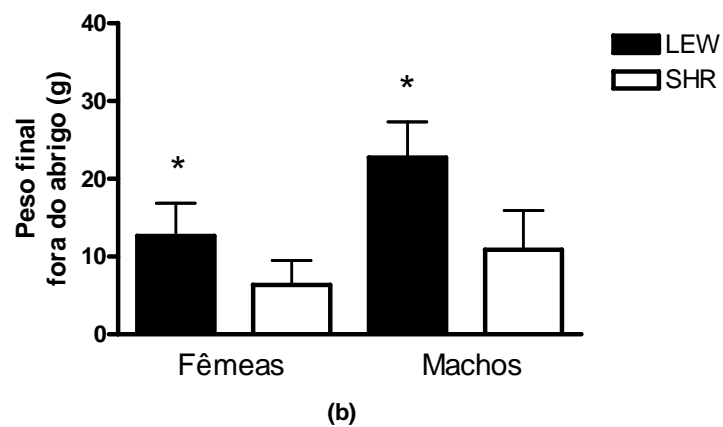
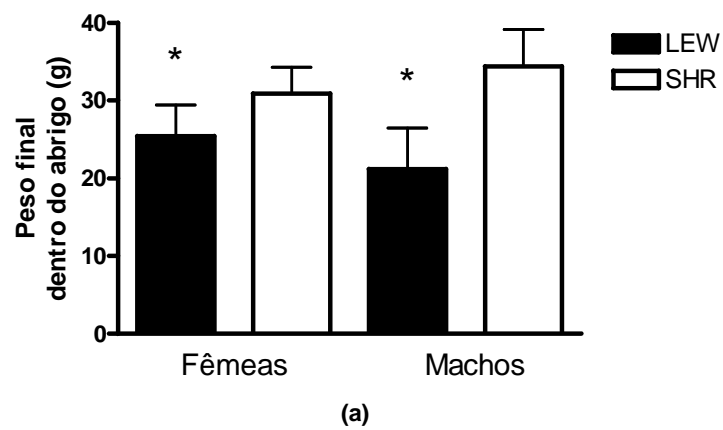


Figura 8 – Peso final de ração dentro (a) e fora (b) do abrigo para ratos LEW e SHR de ambos os sexos. As barras representam os valores médios \pm erro padrão. * representa efeito geral de linhagem (ANOVA, $p < 0,05$).

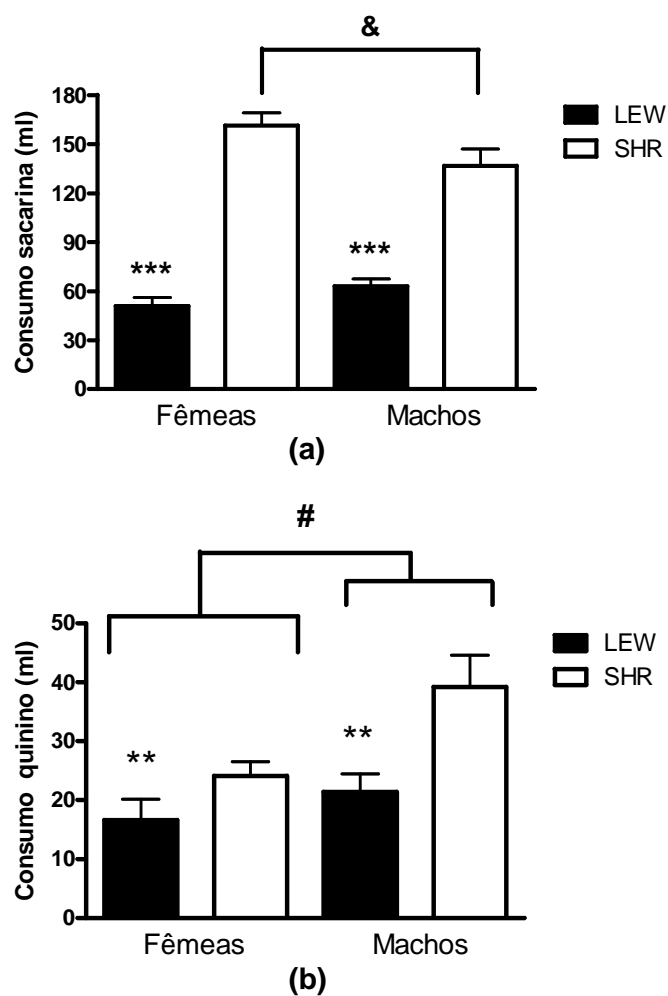


Figura 9 – Ingestão de sacarina (a) e quinino (b) livre escolha para ratos LEW e SHR de ambos os sexos, no protocolo de consumo espontâneo de etanol. As barras representam os valores médios \pm erro padrão. *** e ** representam efeito geral do fator linhagem (ANOVA, $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). & e # representa diferença entre sexos (post hoc Newman-Kells ou ANOVA, $p < 0,05$, respectivamente).

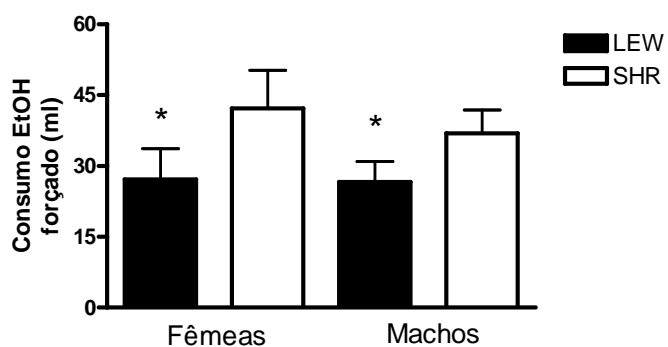


Figura 10 – Consumo de álcool forçado para os ratos LEW e SHR de ambos os sexos, no protocolo de consumo espontâneo de etanol. As barras representam os valores médios \pm erro padrão. * representa efeito linhagem (ANOVA, $p < 0,05$).

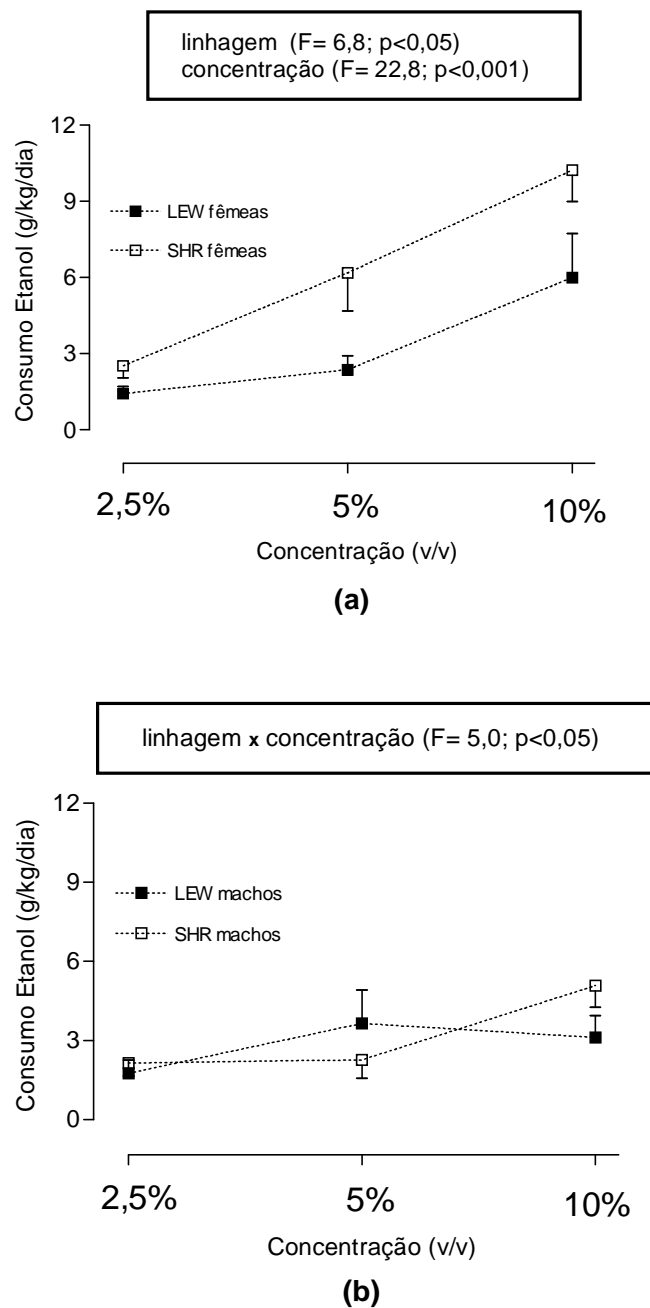


Figura 11 - Consumo (g/kg/dia) de etanol em livre escolha nas concentrações de 2, 5, 5 e 10%, para ratos LEW e SHR fêmeas (a) e machos (b), no protocolo de consumo espontâneo de etanol. Os valores estão representados como média \pm erro padrão. Os efeitos revelados pela ANOVA de 2 vias para medidas repetidas são mostrados na caixa. O teste post hoc Newman-Keuls mostra que os ratos SHR (b) ingeriram quantidades significativamente mais elevadas de etanol na concentração de 10% do que nas concentrações de 2,5 e 5% ($p < 0,05$).

4.1.7 Dosagem de Álcool no Sangue

Os resultados obtidos mostraram efeito significativo do fator sexo sobre a quantidade de álcool no sangue logo após a recuperação do reflexo postural (Figura 13), com as fêmeas apresentando uma maior concentração do que os machos [$F(1,38)= 11,6$ e $p<0,01$]. Nenhuma diferença entre linhagens foi encontrada nesta variável.

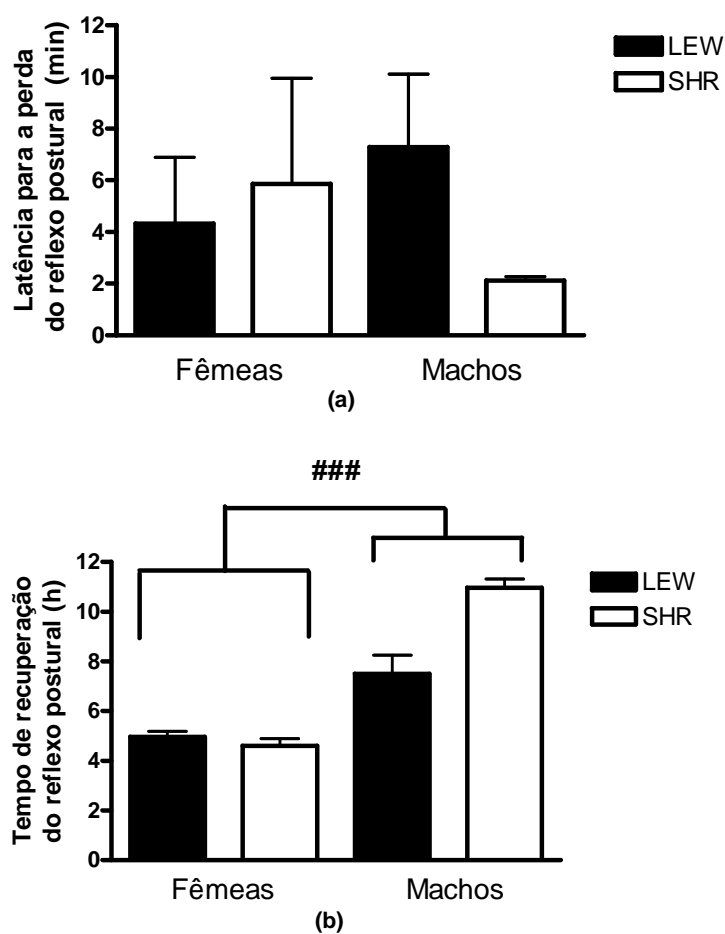


Figura 12 – Latência para a perda do reflexo postural (a) e tempo decorrido até a recuperação do reflexo (b) no teste de perda do reflexo postural, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos. As barras representam os valores médios \pm erro padrão. ### representa efeito sexo (ANOVA, $p<0,001$).

4.1.8 Matriz de Correlação

Os dados referentes à matriz de correlação estão dispostos nas tabelas 1 e 2. Todas as correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) são mostradas. Com relação aos machos, foram encontradas correlações entre as variáveis: tempo gasto no compartimento familiar (PL) com peso final dentro do abrigo ($r=0,57$); locomoção central (CA) com consumo de álcool forçado 10% ($r=0,46$) e álcool 10% ($r=0,48$); tempo no centro (CA) com álcool forçado 10% ($r=0,56$); tempo nos braços abertos (LCE) com peso final fora do abrigo ($r=0,46$); peso final fora do abrigo com álcool 5% ($r=0,52$). Não ocorreram correlações significativas entre o teste do CA e do LCE em machos (Tabela 2). Já para as fêmeas, podemos destacar as correlações entre o número de entradas nos braços abertos (LCE) e o consumo de álcool 2,5% ($r=-0,53$) e álcool 5% ($r=-0,51$); peso final dentro do abrigo e álcool 2,5% ($r=0,46$); peso final fora do abrigo e álcool 10% ($r=-0,45$); concentração de álcool no sangue e álcool 5% ($r=0,55$) (Tabela 1).

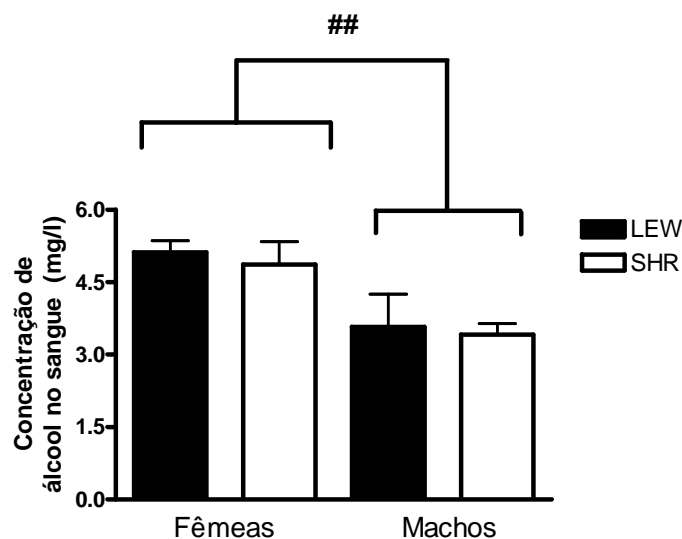


Figura 13 – Concentração de etanol no sangue logo após a recuperação do reflexo postural, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos. As barras representam os valores médios \pm erro padrão. ## representa efeito sexo (ANOVA, $p < 0,01$).

	T FAM	T CEN	L CEN	L PER	T AB	ENT AB	PFD	PFF	CRT	CBR	CBA	SAC	QUI	ALC F	ALC 2,5%	ALC 5%	ALC 10%	TS	CAS
T FAM						-0,52				0,60	0,59	0,60							
T CEN			0,79							0,50	0,86	0,67							
L CEN		0,79								0,54	0,74	0,53							
L PER															-0,51				
T AB						0,92													
ENT AB	-0,52				0,92										-0,53	-0,51			
PFD								-0,93							0,46				
PFF								-0,93			-0,46	-0,45					-0,45		
CRT										0,50			0,46				0,56		
CBR	0,60	0,50	0,54						0,50		0,73	0,68		0,53		0,51			
CBA	0,59	0,86	0,74					-0,46		0,73		0,82					0,52		
SAC	0,60	0,67	0,53					-0,45		0,68	0,82					0,44	0,47		
QUI									0,46						0,62		0,47		
ALC F										0,53									
ALC 2,5%				-0,51		-0,53	0,46						0,62			0,63			
ALC 5%						-0,51				0,51		0,44			0,63		0,58		0,55
ALC 10%								-0,45	0,56		0,52	0,47	0,47			0,58			
TS																			
CAS																0,55			

Tabela 1 – Matriz de correlação mostrando os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$), para fêmeas de ambas as linhagens. Legenda das variáveis de cada teste: *Busca pela novidade*: T FAM = Tempo gasto no compartimento familiar; *Campo aberto*: T CEN = Tempo no centro; L CEN= Locomoção central; L PER= Locomoção periférica; *Labirinto em cruz elevado*: T AB= Tempo nos braços abertos; ENT AB= número de entradas nos braços abertos; *Armazenamento de comida*: PFD= Peso final dentro do abrigo; PFF= Peso final fora do abrigo; CRT= Consumo de ração durante o teste; *Consumo Espontâneo*: CBR= Consumo basal de ração; CBA= Consumo basal de água; SAC= Consumo de sacarina; QUI= Consumo de quinino; ALC F= Consumo de álcool forçado 10%; ALC 2,5%= Consumo de etanol 2,5%; ALC 5%= Consumo de etanol 5%; ALC 10%= Consumo de etanol 10%; *Perda do reflexo postural*: TS= Tempo de sono; CAS= Concentração de álcool no sangue no momento da recuperação do reflexo postural.

MACHOS	T FAM	T CEN	L CEN	L PER	T AB	ENT AB	PFD	PFF	CRT	CBR	CBA	SAC	QUI	ALC F	ALC 2,5%	ALC 5%	ALC 10%	TS	CAS
T FAM				-0,46			0,57												
T CEN			0,46							0,57		0,54	0,47	0,56					
L CEN		0,46												0,46			0,48		
L PER	-0,46						-0,49	0,54			-0,61	-0,70							
T AB						0,78		0,46											
ENT AB					0,78						-0,53								
PFD	0,57			-0,49				-0,91			0,46	0,49							
PFF				0,54	0,46		-0,91									0,52			
CRT																			
CBR												0,57	0,61					0,50	
CBA		0,57		-0,61		-0,53	0,46					0,84	0,60						
SAC		0,54		-0,70			0,49			0,57	0,84		0,60						
QUI		0,47								0,61	0,60	0,60		0,68	0,75	0,59			
ALC F		0,56	0,46											0,68		0,64	0,61	0,54	
ALC 2,5%														0,75	0,64		0,70		
ALC 5%								0,52						0,59	0,61	0,70			
ALC 10%			0,48											0,54					
TS										0,50									
CAS																			

Tabela 2 – Matriz de correlação mostrando os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$), para machos de ambas as linhagens. Legenda das variáveis de cada teste: *Busca pela novidade*: T FAM = Tempo gasto no compartimento familiar; *Campo aberto*: T CEN = Tempo no centro; L CEN= Locomoção central; L PER= Locomoção periférica; *Labirinto em cruz elevado*: T AB= Tempo nos braços abertos; ENT AB= número de entradas nos braços abertos; *Armazenamento de comida*: PFD= Peso final dentro do abrigo; PFF= Peso final fora do abrigo; CRT= Consumo de ração durante o teste; *Consumo Espontâneo*: CBR= Consumo basal de ração; CBA= Consumo basal de água; SAC= Consumo de sacarina; QUI= Consumo de quinino; ALC F= Consumo de álcool forçado 10%; ALC 2,5%= Consumo de etanol 2,5%; ALC 5%= Consumo de etanol 5%; ALC 10%= Consumo de etanol 10%; *Perda do reflexo postural*: TS= Tempo de sono; CAS= Concentração de álcool no sangue no momento da recuperação do reflexo postural.

4.2 Segundo bloco experimental

4.2.1 Preferência de Lugar

As análises de variância revelaram uma interação entre linhagem e tratamento para o tempo gasto no compartimento novo [$F(1,56) = 4,1$ e $p < 0,05$], sendo que a diferença entre linhagens foi encontrada somente nos animais agrupados. Neste caso, os ratos SHR passaram mais tempo no compartimento novo do aparato do que os ratos LEW (Figura 18a). Não foram encontradas diferenças significativas para o tempo passado no compartimento familiar (Figura 18b). O maior tempo gasto por ratos SHR no compartimento familiar encontrado no primeiro bloco experimental, se mostrou como tendência não significativa no atual experimento, se considerarmos apenas os animais isolados.

4.2.2 Campo Aberto

Os resultados obtidos no teste do campo aberto estão dispostos na Figura 19. Para a locomoção central, ocorreu uma interação entre linhagem e tratamento [$F(1,56) = 4,6$ e $p < 0,05$], sendo que o isolamento teve efeito apenas na linhagem SHR, com os ratos isolados apresentando os menores índices nesta medida e parecendo, portanto, mais ansiosos (Figura 19a). Além disso, observou-se um efeito significativo do fator sexo [$F > M$; $F(1,56) = 12,0$ e $p < 0,01$]. A mesma interação linhagem x tratamento foi encontrada para o tempo no centro (dados não mostrados), novamente com o isolamento tendo efeito somente na linhagem SHR, diminuindo o tempo gasto nesta área do aparato [$F(1,56) = 4,7$ e $p < 0,05$]. O isolamento social diminuiu em ambas as linhagens a locomoção periférica [$F(1,56) = 12,2$ e $p < 0,001$]. Também foi encontrado efeito significativo do fator sexo para a locomoção periférica [$F > M$; $F(1,56) = 28,7$ e $p < 0,001$].

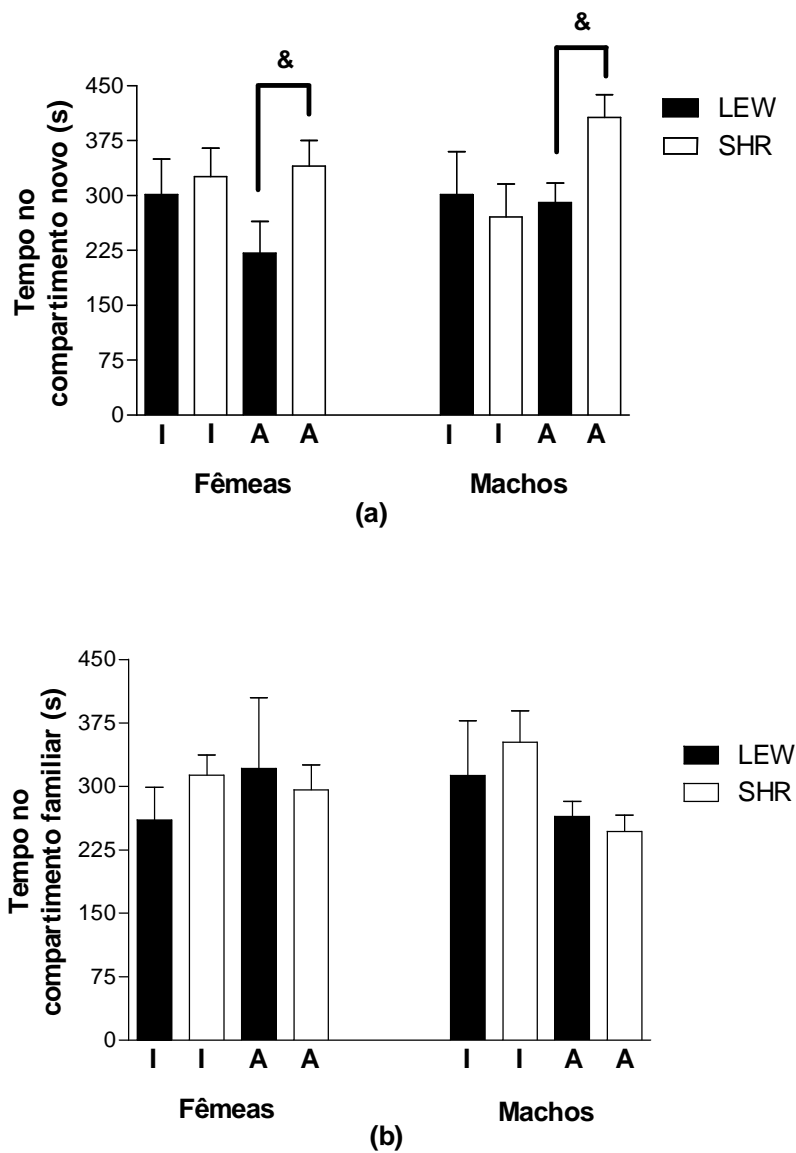


Figura 14 – Tempo passado no compartimento novo (a) e familiar (b) para ratos LEW e SHR de ambos os sexos e tratamentos (isolados ou agrupados). As barras representam os valores médios \pm erro padrão. & representa diferenças entre ratos LEW e SHR agrupados segundo o teste post hoc Newman-Kells ($p < 0,05$).

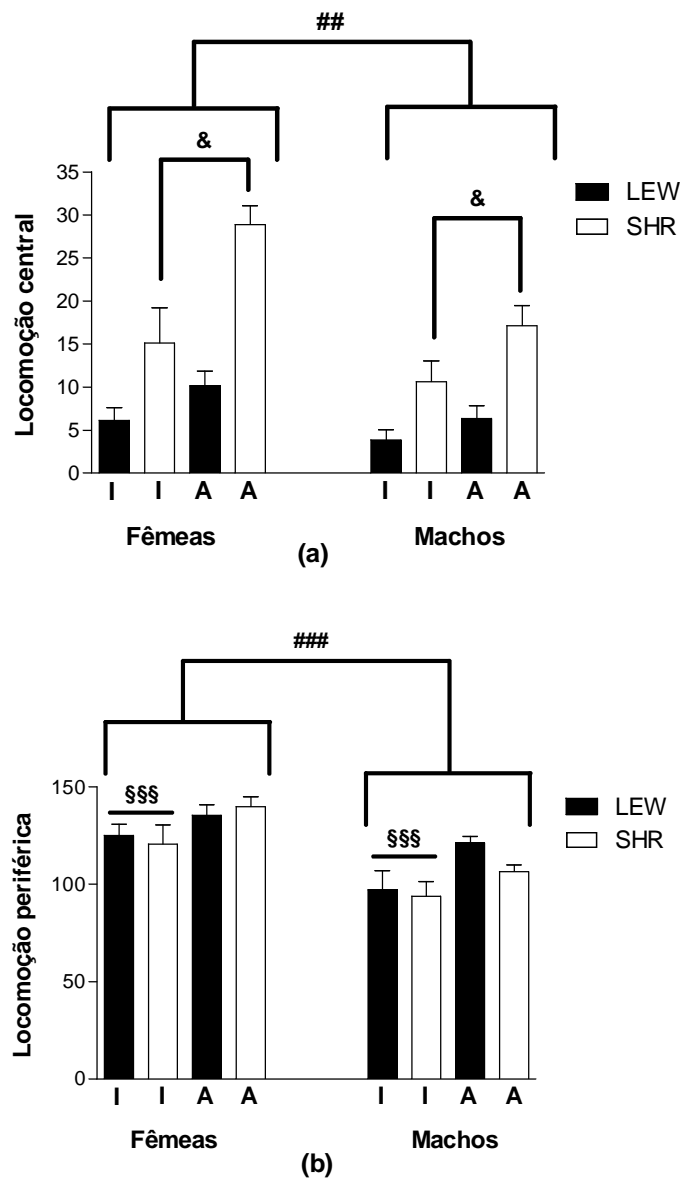


Figura 15 – Locomoção no centro (a) e na periferia (b), do campo aberto, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos e tratamentos (isolados ou agrupados). As barras representam os valores médios \pm erro padrão. ## e ### representam efeito geral do fator sexo (ANOVA, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). & representa diferenças entre ratos SHR isolados e agrupados segundo o teste post hoc Newman-Kells ($p < 0,05$). \$\$\$ representa efeito geral do fator tratamento (ANOVA, $p < 0,001$).

4.2.3 Labirinto em Cruz Elevado

Os resultados obtidos neste teste são mostrados na Figura 20. As análises de variância mostraram interação entre linhagem e tratamento para o número e a % de entradas nos braços abertos, com os ratos LEW isolados realizando maior número e % de entradas do que os SHR isolados [$F(1,56) = 4,2$ e $4,7$, respectivamente, $p < 0,05$]. A ANOVA revelou diferenças gerais de linhagem e sexo no número de entradas nos braços abertos [$F > M$; $F(1,56) = 5,7$ e $p < 0,05$] e fechados [$LEW > SHR$; $F(1,56) = 4,7$ e $p < 0,05$; $F > M$; $F(1,56) = 9,5$ e $p < 0,01$], tempo nos braços abertos [$F > M$; $F(1,56) = 5,9$ e $p < 0,05$] e tempo nos braços fechados [$LEW > SHR$; $F(1,56) = 34,1$ e $p < 0,001$; $M > F$; $F(1,56) = 4,5$ e $p < 0,05$] (dados não mostrados).

5. Discussão

O objetivo principal do presente trabalho foi estudar a influência de fatores ambientais e genéticos sobre medidas comportamentais relacionadas à ansiedade, busca pela novidade e impulsividade e a possível correlação entre elas e o consumo de etanol. Para tal, ratos das linhagens isogênicas LEW e SHR foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais, além de testes de preferência e sensibilidade ao etanol.

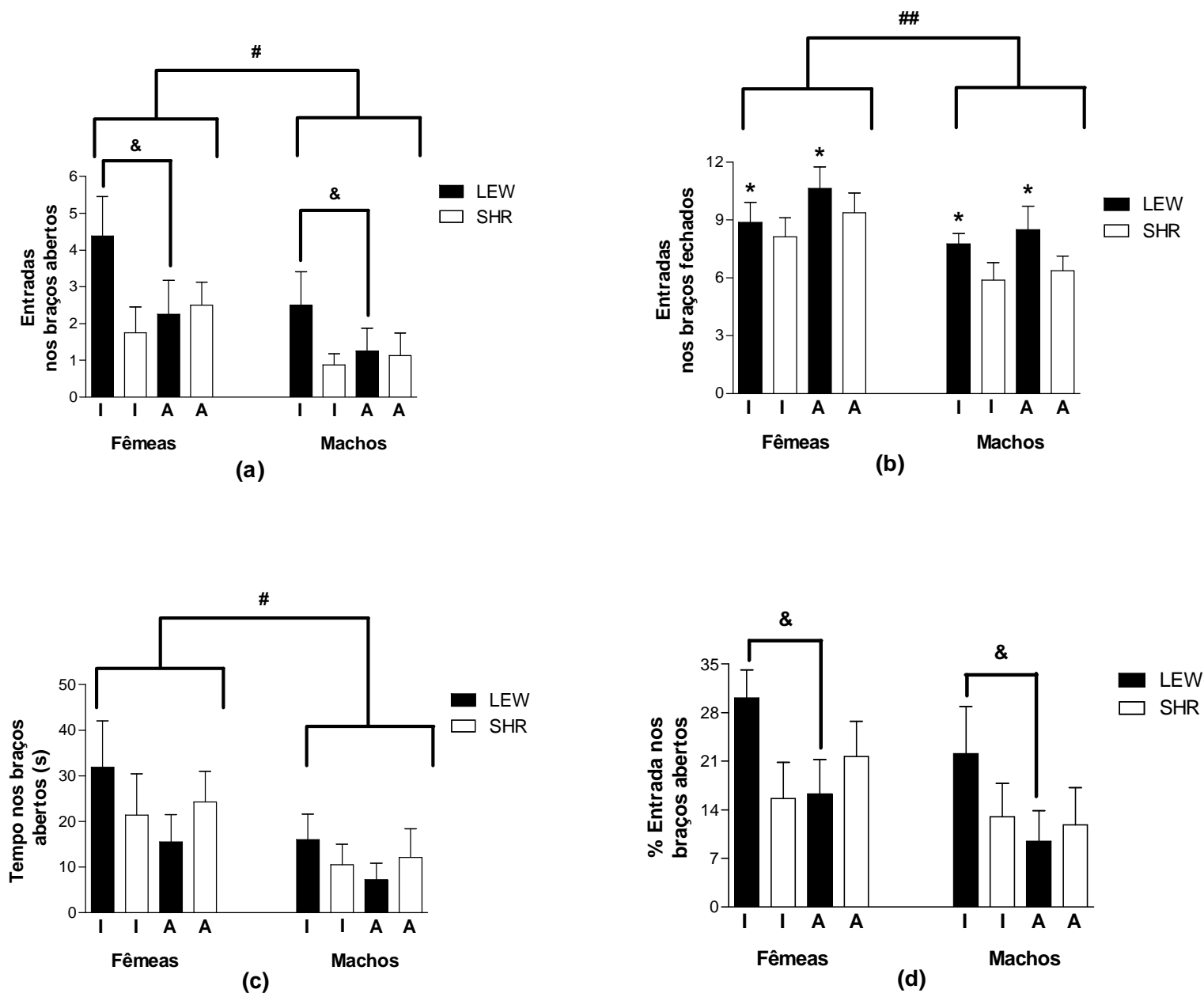


Figura 16 – Número de entradas nos braços abertos (a) e fechados (b), tempo passado nos braços abertos (c) e % de entradas nos braços abertos (d) do labirinto em cruz elevado, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos e tratamentos (isolados ou agrupados). As barras representam os valores médios \pm erro padrão. & representa diferenças entre ratos LEW isolados e agrupados segundo o teste post hoc Newman-Kells ($p < 0,05$). # e ## representam efeito sexo (ANOVA, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). * representa efeito geral do fator linhagem (ANOVA, $p < 0,05$).

5.1 Primeiro bloco experimental

Diversos experimentos com roedores têm sido realizados no intuito de se entender melhor a possível relação entre comportamentos relacionados à ansiedade e ao alcoolismo. Os resultados obtidos no presente estudo não corroboram totalmente a nossa primeira hipótese, de que existiria uma correlação positiva entre os níveis de ansiedade inata e o consumo de etanol. Através das duas matrizes de correlação originadas no primeiro bloco experimental, podemos observar que existe uma correlação entre alta ansiedade no LCE e alto consumo de etanol somente em fêmeas (Tabela 1). É válido lembrar que este primeiro bloco experimental foi realizado com animais isolados durante toda a bateria de testes comportamentais. Isso foi realizado com o intuito de proporcionar um maior controle de possíveis variáveis ambientais e para possibilitar o protocolo de auto-administração de álcool (Crabbe *et al.*, 1999; Chesler *et al.*, 2002; Izídio *et al.*, 2005; Wahlsten *et al.*, 2006). Entretanto, nesta condição experimental, os nossos resultados no LCE mostraram um perfil comportamental diferente do que normalmente é observado, com ratos LEW aproximando-se mais dos braços abertos do que ratos SHR (Ramos *et al.*, 1997; 2002; Izídio *et al.*, 2005; Chiavegatto *et al.*, 2008). Estudos prévios têm mostrado repetidas vezes que a linhagem SHR, supostamente por exibir menores índices de ansiedade experimental, entra mais e permanece mais tempo nos braços abertos do LCE do que a linhagem LEW (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002). Considera-se a preferência pelos braços abertos ou fechados como um índice experimental de ansiedade, ou seja, quanto maiores os níveis de “ansiedade”, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos. No presente estudo, porém, observou-se um aumento na atividade locomotora e uma diminuição da esquiva dos braços abertos da linhagem LEW.

Apesar da aparente simplicidade da situação de teste, muitos fatores influenciam a aversão aos braços abertos. Alguns deles estão ligados ao procedimento experimental, como o período do dia em que o teste é feito, ou os níveis de luminosidade da sala experimental (Bertoglio e Carobrez, 2002). Além disso, manipulações experimentais também alteram o comportamento dos animais no teste do labirinto, tais como o experimentador específico administrando o teste (Lewejohann *et al.*, 2006), o alojamento individual ou em grupo (Maisonnette *et al.*, 1993), e o estado comportamental do animal imediatamente antes do teste (Izídio *et al.*, 2005). Este foi o primeiro estudo realizado em nosso laboratório onde os animais permaneceram em gaiolas individuais durante toda a bateria de testes. Portanto, a inversão nos níveis de ansiedade experimental entre ratos LEW e SHR e a correlação positiva em fêmeas entre os níveis de ansiedade no LCE e o consumo de etanol deve ser, a princípio, entendida como dependente de uma condição de isolamento social.

Além disso, os presentes resultados demonstraram maior consumo de etanol e menor emocionalidade no CA em ratas SHR. Embora os ratos LEW sejam considerados mais “ansiosos” e, segundo a literatura, predispostos ao consumo de drogas de abuso (Kosten *et al.*, 1994), eles ingeriram menores quantidade de etanol do que os ratos SHR. Algumas possibilidades podem ser sugeridas na tentativa de explicar este resultado. Os ratos SHR, além da utilidade no estudo da ansiedade, são considerados um modelo genético para o estudo do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), por exibirem prejuízo em manter a atenção, hiperatividade em algumas situações e serem ávidos por novidades e por situações de risco (Sagvolden *et al.*, 2005). Estas características têm sido consideradas como fatores de risco para o desenvolvimento de dependência química, incluindo o alcoolismo (Wilens *et al.*, 1997). Assim, nossos resultados estão de acordo com

tal proposição e com estudos prévios da literatura, onde ratos SHR consumiram maiores quantidades de etanol e foram menos ansiosos que ratos LEW (Da Silva *et al.*, 2004; 2005; Vendruscolo *et al.*, 2006). Os resultados do presente estudo também demonstraram que os ratos SHR consomem maiores quantidades de sacarina e quinino (substâncias doces e amargas, respectivamente) do que os ratos LEW, sugerindo que os ratos SHR possam ter maior atração por líquidos inéditos. Diversos estudos têm demonstrado uma relação positiva entre o consumo de substâncias doces (ex. sacarina) e o abuso de álcool, tanto em humanos quanto em animais (Kampov-Polevoy *et al.*, 1997). Em animais de laboratório, a seleção de ratos para altos e baixos níveis de consumo de substâncias adocicadas prediz a auto-administração de drogas (ver revisão Carrol *et al.*, 2008 para maiores detalhes). Esta tendência dos ratos SHR a consumirem maiores quantidades de substâncias novas manifesta um traço comportamental complexo e freqüentemente correlacionado com o risco ao abuso de substâncias: a busca pela novidade. De acordo com Cloninger (1987), os alcoolistas do Tipo 1 seriam aqueles indivíduos com baixo grau de desejo por novidades e alto grau de esquiva de ambientes novos e aversivos. Já os alcoolistas do Tipo 2 apresentariam alto desejo por novidades e comportamentos de risco, o que poderia estar representado na linhagem SHR.

Todavia, resultados controversos já foram encontrados no nosso laboratório quanto à ingestão de etanol nas linhagens LEW e SHR. Enquanto alguns estudos encontraram uma correlação positiva entre os níveis de ansiedade inata e consumo de etanol (Chiavegatto *et al.*, 2008); outros falharam ao tentar encontrar esta associação (Da Silva *et al.*, 2004; 2005; Vendruscolo *et al.*, 2006), sugerindo que mudanças no protocolo experimental podem afetar profundamente as diferenças encontradas nestas linhagens. Algumas hipóteses podem ser formuladas na tentativa de se explicar essas diferenças. Sabe-se que eventos

estressantes levam a uma ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), iniciando com a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, e posterior liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela glândula pituitária, para resultar na secreção de hormônios glicocorticóides da glândula adrenal. Hansen e colaboradores (1995) demonstraram que o aumento dos níveis de corticosterona causado pelo estresse da restrição de comida, provoca um acréscimo do consumo de etanol, confirmando o papel deste hormônio na modulação do consumo de etanol em animais. Em ratos, a adrenalectomia está ligada a uma diminuição do consumo de etanol (Fahlke *et al.*, 1994; 1996), sendo que este feito pode ser revertido pelo tratamento com corticosterona (Fahlke *et al.*, 1994). Ratos da linhagem LEW apresentam falta, ou um aumento atenuado, dos níveis de CRH, ACTH e de corticosterona em resposta a uma variedade de eventos estressantes, quando comparados com outras linhagens de ratos (Sternberg *et al.*, 1992). Sendo assim, se considerarmos que a exposição prévia a uma bateria de testes comportamentais aversivos aliada ao fato de os animais estarem sofrendo o estresse do isolamento social, sejam eventos promotores de liberação de corticosterona, o consumo de etanol poderia estar aumentado na linhagem SHR por esta ser mais reativa ao estresse do ponto de vista fisiológico (Goméz *et al.*, 1998). Dados de Vendruscolo e colaboradores (2006), no entanto, não indicam nenhuma diferença importante na reatividade do eixo HPA entre ratos LEW e SHR.

Nossa segunda hipótese postulava que comportamentos relacionados à impulsividade e à busca pela novidade estariam ligados com um alto consumo de etanol. Esta hipótese também não foi confirmada pelos nossos resultados. Como discutido anteriormente, os ratos SHR consumiram maiores quantidades de etanol (somente em fêmeas), sacarina e quinino que os ratos LEW. Entretanto, alguns resultados foram

surpreendentes. Por exemplo, em relação ao teste de busca pela novidade, pela primeira vez aplicado às linhagens LEW e SHR, os resultados sustentam que, além da linhagem SHR não ter passado mais tempo no ambiente novo, ela gastou uma quantidade de tempo maior no ambiente previamente conhecido do que a linhagem LEW, já estabelecida como a mais “ansiosa” (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002). Nós propomos duas hipóteses alternativas para explicar este fato inesperado. Primeiramente, foram utilizadas apenas duas sessões de habituação, o que pode não ser suficiente para que os ratos SHR se habituem completamente com o ambiente dito familiar, devido aos seus problemas inatos de suposta falta de atenção (Russell, 2007). Em segundo lugar, o isolamento social prévio ao teste, um estímulo estressor bem estabelecido na literatura (Sahakian *et al.*, 1974; Jones *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1998), pode ter causado um aumento nos níveis de ansiedade de forma mais acentuada em ratos SHR, fazendo com que estes animais se tornassem mais neofóbicos e explorassem menos o compartimento novo. Nós testamos esta hipótese no segundo bloco de experimentos e o isolamento social, de fato, evidenciou-se um estímulo altamente ansiogênico, principalmente para a linhagem SHR, como será discutido posteriormente.

No teste de impulsividade (armazenamento de comida), os ratos SHR, que por serem um modelo de TDAH mundialmente conhecido deveriam teoricamente ser mais “impulsivos”, foram os mais “precavidos”. Após um dia de privação de comida, eles em geral guardaram mais comida no abrigo do que os ratos LEW, que aparentemente não deram muita atenção para a situação e/ou não tiveram a reação de guardar comida. Uma diminuição no comportamento de estocar alimento pode ser visto como um sinal de aumento da impulsividade (Johansson *et al.*, 1999). Foram os ratos LEW também que consumiram menos comida durante o teste, mesmo tendo passado 24h privados de alimentação. Estes resultados também vão contra nossa hipótese inicial, de que os ratos

SHR se aproximariam mais de situações potencialmente perigosas, como o centro do campo aberto, os braços abertos do labirinto em cruz e o compartimento branco da caixa branca/preta (Ramos *et al.*, 1997), por serem mais impulsivos do que os ratos LEW. Ou seja, os presentes dados sugerem que ratos SHR não se aproximam mais de ambientes aversivos por falta de um mecanismo de inibição ou “freio” comportamental e sim por sentirem de fato menor medo ou aversão do que os ratos LEW. Devemos considerar, no entanto, que o modelo de impulsividade utilizado, é certamente limitado, sujeito a críticas e pode estar revelando neste caso algum outro aspecto comportamental não relacionado com a impulsividade, mas sim com simples estratégias de forrageamento, por exemplo.

Os resultados obtidos na análise de correlação demonstram um perfil diferente para os dois sexos e a falta de correlação entre medidas supostamente relacionadas à “impulsividade” e/ou busca pela novidade com o consumo de álcool. Nas fêmeas, o tempo gasto no compartimento familiar foi correlacionado negativamente com o número de entradas nos braços abertos, sugerindo que as ratas mais “ansiosas” no labirinto tendem a ser também mais “neofóbicas”. Para os machos, o tempo gasto no compartimento familiar correlacionou-se positivamente com o peso final de alimento dentro do abrigo, uma medida considerada relacionada à baixa “impulsividade” (Johansson *et al.*, 1999). Além disso, o tempo no braço aberto do LCE correlacionou-se positivamente com o peso final da ração fora do abrigo no teste do armazenamento de comida. Em conjunto, estes resultados sugerem que, em fêmeas, a busca pela novidade parece estar associada com baixa “ansiedade experimental”, e que, em machos, a baixa “ansiedade experimental” parece estar relacionada com a baixa impulsividade. É essencial observar, no entanto, que estas matrizes de correlação se baseiam em dados brutos obtidos de apenas duas linhagens isogênicas que são contrastantes para alguns dos comportamentos avaliados. Desta forma,

toda a variabilidade genética presente nas amostras se distribui de forma polarizada entre dois extremos, fazendo com que as variáveis mais contrastantes entre as duas linhagens tendam a se mostrar correlacionadas, mesmo que estejam associadas de forma aleatória (e não biológica) nestas linhagens específicas.

A nossa terceira hipótese foi fundamentada na idéia de que a diferença entre as linhagens em relação ao consumo de etanol se deveria a uma sensibilidade diferenciada aos efeitos do etanol. No teste de perda do reflexo postural, pôde-se observar uma tendência dos ratos SHR machos a levar mais tempo para recuperar o reflexo postural do que os machos LEW. Os resultados evidenciaram uma marcante diferença entre os sexos, com os machos demorando mais tempo para se recuperarem do que as fêmeas, sugerindo assim que fêmeas são menos sensíveis aos efeitos do etanol e/ou metabolizam mais rapidamente esta droga. Para elucidar esta questão, foi feita a dosagem de álcool no sangue no momento da recuperação do reflexo postural. Os resultados mostraram uma maior concentração de álcool no sangue das fêmeas de ambas as linhagens em relação aos machos, sugerindo, portanto, que elas são de fato menos sensíveis aos efeitos psicotrópicos do etanol e não que elas metabolizam a droga mais rapidamente do que machos. Interessantemente, apesar das fêmeas SHR terem ingerido maiores quantidades de etanol do que as fêmeas LEW, não foram evidenciadas diferenças significativas entre as linhagens no tempo de recuperação do reflexo postural e na dosagem de álcool no sangue. Isto sugere que o consumo aumentado das fêmeas SHR em relação às LEW não se deve a uma sensibilidade ou metabolização diferenciada, nos permitindo supor que as fêmeas SHR escolheram espontaneamente atingir níveis mais altos de efeito psicotrópico do álcool. Os resultados nos permitem ainda ressaltar um ponto importante com relação às diferenças de metabolismo entre os machos das duas linhagens. Apesar de ter aparecido uma forte tendência dos ratos LEW em

recuperar o reflexo postural mais rapidamente do que os ratos SHR, não houve diferenças na concentração de etanol no sangue dos machos destas duas linhagens no momento da recuperação deste reflexo. Isto pode ser interpretado como indício de uma menor taxa de metabolização da droga nos machos SHR, porém este fato não se estende às fêmeas da mesma linhagem. Assim, nossa terceira hipótese foi rejeitada, pois as diferenças presentes em fêmeas no consumo de etanol não se devem a fatores como sensibilidade ou metabolismo diferenciados.

Nossa quarta hipótese sugeria que podem existir diferenças sexuais importantes nos resultados de cada teste comportamental e na inter-relação entre eles. Como já foi previamente discutido, esta hipótese foi confirmada. Um dos aspectos mais intrigantes com relação ao abuso de álcool e suas psicopatologias associadas é a ocorrência de diferenças quantitativas e qualitativas dramáticas entre homens e mulheres. Em humanos, homens geralmente consomem mais álcool e tem uma maior prevalência de alcoolismo do que as mulheres (Harford *et al.*, 1998). Entretanto, os transtornos de ansiedade são mais prevalentes em mulheres (Kinrys *et al.*, 2005). Já em roedores, as fêmeas têm mostrado consumir maiores quantidades de etanol (Almeida *et al.*, 1998; Cailhol e Mormède, 2002; Da Silva *et al.*, 2004) com possível participação de hormônios sexuais, como por exemplo, o estradiol (Marinelli *et al.*, 2003). Nossos resultados confirmam estes achados, com as fêmeas consumindo quantidades significativamente maiores de etanol do que os machos. Além disso, as diferenças entre linhagens foram encontradas somente nas fêmeas, com as ratas SHR bebendo e mostrando maior preferência pelo etanol do que as ratas LEW. A análise de correlação permitiu evidenciarmos um fato muito interessante com relação às diferenças inter-sexuais. Nas fêmeas, o consumo de etanol a 2,5 e 5% foi correlacionado negativamente com o número de entradas nos braços abertos, ou seja, quanto maior o

consumo de etanol nestas concentrações, menor a entrada nos braços abertos do labirinto, e vice-versa. Sendo os braços abertos do LCE um ambiente altamente aversivo, baseado na tendência natural dos roedores de se esquivarem de locais altos e abertos (Pellow *et al.*, 1985), podemos sugerir que as ratas mais “ansiosas” foram as que consumiram maiores quantidades de etanol, como seria esperado se considerarmos a comorbidade clínica entre alcoolismo e ansiedade.. Já para os machos, o consumo de etanol forçado e etanol 10% em livre escolha foram correlacionados positivamente com a locomoção central no campo aberto. Este aparato é geralmente considerado como sendo um ambiente estressante e causador de medo em roedores (Hall, 1934). Os animais mais “ansiosos” tendem a manter distância da parte central do aparato, onde eles não podem sentir as paredes (tigmotaxia). Portanto, podemos inferir que a correlação entre os níveis de ansiedade inata e o consumo de etanol é diferenciada entre os sexos, mostrando-se positiva para as fêmeas e negativa para os machos. Obviamente, é preciso ter cautela nestas suposições, pois as diferenças foram encontradas em testes de emocionalidade distintos e existe um número crescente de evidências para o fato de que diferentes testes podem acessar diferentes respostas comportamentais em roedores (Ramos e Mormède, 1998; Ramos, 2008).

Nas fêmeas, as duas medidas de “ansiedade” do campo aberto (locomoção e tempo no centro) correlacionaram-se positivamente com o consumo de ração, água e sacarina. Sabe-se, que o neuropeptídeo Y (NPY), um neurotransmissor amplamente distribuído no sistema nervoso central de mamíferos, está intimamente relacionado com o controle da ingestão de alimentos e alguns aspectos comportamentais. O NPY parece ser o mais potente estimulador da fome (Stanley *et al.*, 1985), e alguns estudos têm sugerido uma correlação negativa entre os níveis de ansiedade e NPY (Heilig *et al.*, 1989; 1993). Portanto, podemos sugerir que as correlações encontradas em fêmeas entre o consumo de alimento e menor

ansiedade experimental poderiam estar, de alguma forma, relacionadas com os níveis de NPY. Por outro lado, como discutido acima, podemos também supor simplesmente que esta correlação se deve ao fato de fêmeas SHR irem mais ao centro do campo aberto e também consumirem mais líquidos e ração, quando comparadas com as fêmeas LEW. Em machos, também foram encontradas correlações positivas entre o tempo no centro e o consumo de diversas substâncias, como sacarina, quinino, álcool forçado e água. Além disso, a locomoção central apareceu relacionada ao consumo de álcool forçado e álcool 10%. Aparentemente, os ratos menos ansiosos estão mais propensos a consumir líquidos inéditos, sugerindo uma ligação entre os níveis de ansiedade e a busca pela novidade. Diante do exposto acima fica claro que nossa quarta hipótese foi confirmada.

Em conclusão, os resultados do primeiro bloco experimental sugerem que este par de linhagens pode constituir um modelo genético para o estudo do alcoolismo, suas patologias relacionadas e seus fatores ambientais causadores. Estudos futuros com estas duas linhagens deverão elucidar mais a respeito de quais comportamentos estão realmente relacionados com o consumo de álcool. No atual momento não podemos afirmar que as ratas SHR consomem mais etanol por serem mais ansiosas, por serem menos sensíveis aos seus efeitos ou por metabolizarem mais rapidamente este composto. Estes resultados mostraram ainda que, apesar da robustez do modelo LEW/SHR, algumas diferenças na emocionalidade podem depender de algumas condições ambientais presentes ao longo da vida dos animais.

5.2 Segundo bloco experimental

Como já foi dito anteriormente, as diferenças encontradas entre as linhagens com relação ao teste de busca pela novidade e LCE no primeiro bloco experimental não estavam

de acordo com o esperado. A linhagem que normalmente exibe maiores níveis de ansiedade experimental (LEW) entrou mais vezes e gastou mais tempo explorando os braços abertos do LCE do que os ratos SHR. Apesar deste teste ser um dos modelos animais de ansiedade mais utilizados, pouco se conhece sobre o(s) evento(s) responsáveis pela aversão e quais seriam as causas da esquia dos braços abertos. Devemos considerar, no entanto, que o estresse prévio de isolamento social, ao qual os animais foram submetidos antes do teste do LCE, pode ter anulado ou mesmo invertido as diferenças normalmente observadas entre as linhagens em estudos prévios.

O isolamento de um animal do seu grupo social para análises experimentais é uma situação freqüentemente utilizada por pesquisadores de diversas instituições, às vezes sem considerar o grau de estresse que isto representa ao animal que, naturalmente, vive em grupo (Genaro e Schmidek, 2002). Esta prática, no entanto, é necessária para experimentos de consumo e preferência de etanol, onde se necessita medir o consumo diário de cada animal individualmente. Inúmeros parâmetros têm sido utilizados para analisar os efeitos do isolamento social, merecendo destaque a atividade exploratória, a atividade locomotora e a reatividade emocional. Esta análise é importante para se compreender as mudanças comportamentais e fisiológicas decorrentes da privação social (Bardo *et al.*, 1997; Bassi *et al.*, 2007; Brenes *et al.*, 2008). Ratos normalmente vivem em grupos, sendo fundamental o contato com outros animais durante o período da adolescência para o estabelecimento da organização social destes grupos (Varlinskaya *et al.*, 2008). A falta de contato físico gera uma série de reações comportamentais e fisiológicas que irão afetar consideravelmente a reatividade emocional de ratos adultos (Weiss *et al.*, 2004). O isolamento social, portanto, é considerado um estímulo crônico de estresse e produz uma síndrome bem caracterizada que consiste de hiperatividade (Sahakian *et al.*, 1974; Jones *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1998),

aumento da atividade locomotora em resposta a ambientes novos (Hall *et al.*, 1998; Thorsell *et al.*, 2006; Ago *et al.*, 2007), comportamento agressivo (Wongwitdecha *et al.*, 1996), déficit da inibição do prepulso (Geyer *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1999), além de mudança em certos parâmetros endócrinos (Ehlers *et al.*, 1993; Pohorecky *et al.*, 2008). Estes efeitos envolvem várias vias, em particular, o sistema dopaminérgico mesolímbico (Geyer *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1999). Além disso, o isolamento social é capaz de induzir modificações morfológicas no comprimento e densidade dendríticas de neurônios do córtex pré-frontal e do *nucleus accumbens* (Alquicer *et al.*, 2008). Estas modificações anatômicas estão associadas com o aumento da atividade locomotora em um ambiente novo e estressante (Alquicer *et al.*, 2004; 2008).

Para avaliar o possível efeito do isolamento social, nós dividimos os ratos de ambas as linhagens isogênicas em dois grupos experimentais (isolados e agrupados) e os submetemos ao teste de busca pela novidade, ao CA e ao LCE. Curiosamente, as respostas comportamentais dos ratos isolados se mostraram bastante diferentes daquelas dos ratos agrupados, de maneira distinta entre as linhagens em alguns testes. No teste de busca pela novidade, encontrou-se diferença significativa entre as linhagens somente entre os ratos agrupados, com os ratos SHR passando maior tempo no compartimento novo em relação aos ratos LEW. Assim, quando os animais não são submetidos ao estresse do isolamento social a linhagem SHR aparece como a mais atraída pela novidade, ou seja, a mais neofílica ou a menos neofóbica. Este perfil, que seria esperado nesta linhagem pouco “ansiosa”, é anulado em uma situação de isolamento social e, conseqüentemente, as diferenças entre as duas linhagens desaparecem. No caso do primeiro bloco experimental, os resultados, por alguma razão que ainda não conhecemos, foram um pouco diferentes, mostrando que o isolamento fez com que a linhagem SHR passasse mais tempo no compartimento familiar

do que a LEW. Deste modo, quando os ratos encontram-se agrupados, que é a situação rotineira em nosso biotério, parece que as diferenças emocionais repetidamente observadas entre as linhagens em vários testes, podem estar relacionadas a diferenças em “neofobia”, ou seja, a uma maior aversão por estímulos novos em ratos LEW. Um dos traços da personalidade humana proposto por Cloninger (1986) se chama “novelty seeking” ou “busca pela novidade” e, de acordo com diversos estudos, este traço parece ter implicações no desenvolvimento de dependência de drogas (ver revisão Bardo *et al.*, 1996).

No teste do CA, o isolamento social mostrou-se um forte estímulo ansiogênico para a linhagem SHR. A falta de contato físico com outros animais foi capaz de provocar uma diminuição significativa da locomoção central e do tempo gasto no centro por ratos desta linhagem. É interessante ressaltar que, apesar do isolamento ter tido efeitos gerais sobre a % de locomoção central, locomoção periférica e total (diminuição) em ambas as linhagens, ele não afetou significativamente a aproximação à área mais aversiva do aparato para a linhagem LEW. Já foi demonstrado que o isolamento social crônico provoca um aumento na reatividade emocional ao estresse e produz uma hiperfunção do eixo HPA em ratos adultos (Weiss *et al.*, 2004). Como mencionado anteriormente, a ativação do eixo HPA é diferenciada entre as duas linhagens utilizadas no presente estudo, podendo em parte explicar as diferenças encontradas (Gómez *et al.*, 1998). Dados de Vendruscolo e colaboradores (2006), no entanto, não indicam nenhuma diferença importante na reatividade do eixo HPA entre ratos LEW e SHR.

Os resultados mais expressivos foram encontrados no teste do LCE. O isolamento teve efeito somente na linhagem LEW, promovendo um aumento do número e % de entradas nos braços abertos. Estes achados estão condizentes com os do primeiro bloco experimental e confirmam que o isolamento é capaz de reverter as diferenças normalmente

encontradas entre as linhagens neste teste (Ramos *et al.*, 1997; 1998). Apesar do aparente efeito ansiolítico do isolamento para a linhagem LEW, temos que levar em conta que um dos efeitos mais replicáveis do isolamento social é a hiperatividade em um ambiente novo (Sahakian *et al.*, 1974; Jones *et al.*, 1992). Um aumento no número de entradas nos braços abertos poderia ser interpretado puramente como um aumento na exploração de um ambiente novo. Resultados discrepantes são encontrados na literatura em relação ao perfil comportamental dos animais isolados. Aumentos dos níveis de ansiedade foram encontrados no CA (Hall *et al.*, 2000) e LCE (Maisonnette *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 2004). Em contrapartida, efeitos ansiolíticos já foram demonstrados no LCE (Voikar *et al.*, 2005; Thorsell *et al.*, 2006). A maioria destes estudos, que apontam uma diminuição da ansiedade, descrevem os animais isolados como sendo hiperativos. É importante fazer a distinção entre locomoção, exploração e ansiedade. Sendo este o caso, analisaremos outra variável medida no LCE. O tratamento não provocou diferenças no número de entradas nos braços fechados, uma medida clássica de atividade, mostrando que o aumento da locomoção ocorreu somente nos braços abertos. Em suma, uma explicação plausível para os presentes achados seria que o isolamento social pode aumentar os níveis de ansiedade de maneira genótipo-dependente. Ou seja, os ratos SHR, tradicionalmente considerados como menos ansiosos e/ou mais impulsivos, também parecem ser mais sensíveis aos efeitos ansiogênicos do isolamento social, que os tornaria mais ansiosos e mais neofóbicos do que quando em condições normais de agrupamento. Já os ratos LEW, considerados como mais “ansiosos” em diversas situações, parecem ser resistentes ao estresse do isolamento social.

Em conclusão, os resultados do segundo bloco experimental apontam a importância das condições ambientais e genéticas em testes que visam avaliar o perfil comportamental dos animais. O isolamento social, que foi utilizado como maneira de uniformizar a

condição ambiental no primeiro bloco experimental mostrou-se uma variável importante na comparação entre linhagens nestes testes comportamentais. Em alguns casos ele parece causar um efeito ansiogênico, sendo que os ratos SHR parecem ser mais suscetíveis a estes efeitos do que os ratos LEW. Isto sugere que as relações sociais durante o desenvolvimento dos ratos destas linhagens parecem ser essenciais para o comportamento normalmente exibido durante a idade adulta. Tal suposição, obviamente, necessita ser futuramente investigada.

6. Referências Bibliográficas

- ADAMEC, R. E.; BLUNDELL, J.; COLLINS, A. Neural plasticity and stress induced changes in defense in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 721-744, 2001.
- AGO, Y.; TAKAHASHI, K.; NAKAMURA, S.; HASHIMOTO, H.; BABA, A.; MATSUDA, T. Anxiety-like and exploratory behaviors of isolation-reared mice in the staircase test. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 104, p. 153-158, 2007.
- ALLAN, C. A. Alcohol problems and anxiety disorders: a critical review. **Alcohol and Alcoholism**, v. 30, p. 145-151, 1995.
- ALMEIDA, O. F. X.; SHOAIB, M.; DEIKE, J.; FISCHER, D.; DARWISH, M. H.; PATCHEV V. K. Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, p. 2677-2685, 1998.
- ALQUICER, G.; SILVA-GÓMEZ, A. B.; PERALTA, F.; FLORES, G. Neonatal ventral hippocampus lesion alters the dopamine content in the limbic regions in postpubertal rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 22, p. 103-111, 2004.
- ALQUICER, G.; MORALES-MEDINA, J. C.; QUIRION, R.; FLORES, G. Postweaning social isolation enhances morphological changes in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of psychosis. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 35, p. 179-187, 2008.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. **American Psychiatric Press**, 4th edition, Washington, DC, 1994.

- BARDO, M. T.; DONOHEW, R. L.; HARRINGTON, N. G. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 77, p. 23-43, 1996.
- BARDO, M. T.; ROBINET, P. M.; HAMMER JR., R. F. Effect of differential rearing environments on morphine-induced behaviors, opioid receptors and dopamine synthesis. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 251-259, 1997.
- BASSI, G. S.; NOBRE, M. J.; CARVALHO, M. C.; BRANDÃO, M. L. Substance P injected into the dorsal periaqueductal gray causes anxiogenic effects similar to the long-term isolation as assessed by ultrasound vocalizations measurements. **Behavioural Brain Research**, v. 182, p. 301-307, 2007.
- BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural Brain Research**, v. 125, p. 141-149, 2001.
- BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 108, p. 197-203, 2000.
- BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. **Behavioural Brain Research**, v. 132, p. 135-143, 2002.
- BIEDERMAN, J.; WILENS, T. E.; MICK, E.; FARAONE, S. V.; SPENCER, T. Does attention-deficit hyperactivity disorder impact the developmental course of drug and alcohol abuse and dependence? **Biological Psychiatry**, v. 44, p. 269-273, 1998.
- BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 205-218, 2001.
- BOETTIGER, C. A.; MITCHELL, J. M.; TAVARES, V. C.; ROBERTSON, M.; JOSLYN, G.; D'ESPOSITO, M.; FIELDS, H. L. Immediate reward bias in humans: fronto-parietal networks and a role for the catechol-O-methyltransferase 158 (Val/Val) genotype. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 14383-14391, 2007.
- BRENES, J. C.; RODRIGUEZ, O.; FORNAGUERA, J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 89, p. 85-93, 2008.
- CAILHOL, S.; MORMÈDE, P. Conditioned taste aversion and alcohol drinking: strain and gender differences. **Journal of Studies on Alcohol**, v. 63, p. 91-99, 2002.

- CALOGERO, A. E.; STERNBERG, E. M.; BAGDY, G.; SMITH, C.; BERNARDINI, R.; AKSENTIJEVICH, S.; WILDER, R. L.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Neurotransmitter-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness is defective in inflammatory disease-susceptible Lewis rats: in vivo and in vitro studies suggesting globally defective hypothalamic secretion of corticotropin-releasing hormone. **Neuroendocrinology**, v. 55, p. 600-608, 1992.
- CARDENAS, F.; LAMPREA, M. R.; MORATO, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 122, p. 169-174, 2001.
- CARROL, M. E.; MORGAN, A. D.; ANKER, J. J.; PERRY, J. L.; DESS, N. K. Selective breeding for differential saccharin intake as an animal model of drug abuse. **Behavioural Pharmacology**, v. 19, p. 435-460, 2008.
- CHESLER, E. J.; WILSON, S. G.; LARIVIERE, W. R.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; MOGIL, J. S. Influences of laboratory environment on behavior. **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 1101-1102, 2002.
- CHIAVEGATTO, S.; IZIDIO, G. S.; MENDES-LANA, A.; ANEAS, I.; FREITAS, T. A.; TORRÃO, A. S.; CONCEIÇÃO, I. M.; BRITTO, L. R.; RAMOS, A. Expression of alpha-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. **Molecular Psychiatry**, *in print*, 2008.
- CLEMENT, Y.; CALATAYUD, F.; BELZUNG, C. Genetic basis of anxiety-like behavior: a critical review. **Brain Research Bulletin**, v. 57, p. 57-71, 2002.
- CLONINGER, C. R.; BOHMAN, M.; SIGVARDSSON, S. Inheritance of alcohol abuse. Cross-fostering analysis of adopted men. **Archives of General Psychiatry**, v. 38, p. 861-868, 1981.
- CLONINGER, C. R. A unified biosocial theory of personality and its role in the development of anxiety states. **Psychiatric Development**, v. 4, p. 167-226, 1986.
- CLONINGER, C. R. Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. **Science**, v. 236, p. 410-416, 1987.
- COLOMBO, G.; AGABIO, R.; LOBINA, C.; REALI, L.; ZOCCHI, A.; FADDA, F.; GESSA, G. L. Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. **Physiology and Behavior**, v. 57, p. 1181-1185, 1995.
- CONGER, J. Reinforcement theory and the dynamics of alcoholism. **Quarterly Journal of Studies on Alcohol**, v. 17, p. 296-305, 1956.
- CORNELIUS, J. R.; BUKSTEIN, O.; SALLOUM, I.; CLARK, D. Alcohol and psychiatric comorbidity. **Recent Developments in Alcoholism**, v. 16, p. 361-374, 2003.

- CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. **Science**, v. 284, p. 1670-1672, 1999.
- DA SILVA, G. E.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N. Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1511-1517, 2004.
- DA SILVA, G. E.; VENDRUSCOLO, L. F.; TAKAHASHI, R. N. Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 77, p. 693-706, 2005.
- DARBRA, S.; PRAT, G.; PALLARÉS, M.; FERRE, N. Tolerance and sensitization to the hypnotic effects of alcohol induced by chronic voluntary alcohol intake in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 16, p. 79-83, 2002.
- DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 597-609, 2001.
- EHLERS, C. L.; KANEKO, W. M.; OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Effects of gender and social isolation on electroencephalogram and neuroendocrine parameters in rats. **Biological Psychiatry**, v. 33, p. 358-366, 1993.
- FAHLKE, C.; ENGEL, J. A.; ERIKSSON, C. J.; HARD, E.; SODERPALM, B. Involvement of corticosterone in the modulation of ethanol consumption in the rat. **Alcohol**, v. 11, p. 195-202, 1994.
- FAHLKE, C.; HARD, E.; HANSEN, S. Facilitation of ethanol consumption by intracerebroventricular infusions of corticosterone. **Psychopharmacology**, v. 127, p. 133-139, 1996.
- FERNANDEZ-TERUEL, A.; DRISCOLL, P.; GIL, L.; AGUILAR, R.; TOBENA, A.; ESCORIHUELA, R. M. Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 225-231, 2002.
- FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. JR.; ANDREWS, N. Social interaction and elevated plus-maze tests: changes in release and uptake of 5-HT and GABA. **Neuropharmacology**, v. 32, p. 217-221, 1993.
- FILE, S. E. Animal models of different anxiety states. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 48, p. 93-113, 1995.
- FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 125, p. 151-157, 2001.

- GENARO, G.; SCHMIDEK, W. R. The influence of handling and isolation postweaning on open field, exploratory and maternal behavior of female rats. **Physiology and Behavior**, v. 75, p. 681-688, 2002.
- GENTSCH, C.; LICHTSTEINER, M.; FEER, H. Behavioural comparisons between individually and group-housed male rats: effects of novel environments and diurnal rhythm. **Behavioural Brain Research**, v. 6, p. 93-100, 1982.
- GEYER, M. A.; WILKINSON, L. S.; HUMBY, T.; ROBBINS, T. W. Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 34, p. 361-372, 1993.
- GOMEZ, F.; KLOET, E. R.; ARMARIO, A. Glucocortical negative feedback on the HPA axis in five inbred rat strains. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, p. 420-427, 1998.
- GRANT, B. F.; HARFORD T. C. Comorbidity between DSM-IV alcohol use disorders and major depression: results of a national survey. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 39, p. 197-206, 1995.
- GRANT, B. F.; STINSON, F. S.; DAWSON, D. A.; CHOU, S. P.; DUFOUR, M. C.; COMPTON, W.; PICKERING, R. P.; KAPLAN, K. Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Archives of General Psychiatry**, v. 61, p. 807-816, 2004.
- GRAY, J. A.; FLINT, J.; DAWSON, G. R.; FULKER, D. W. A strategy to home-in on polygenes influencing susceptibility to anxiety. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 14, p. 3-10, 1999.
- GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 545-551, 2004.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1934.
- HALL, F. S.; WILKINSON, L. S.; HUMBY, T.; INGLIS, W.; KENDALL, D. A.; MARSDEN, C. A.; ROBBINS, T. W. Isolation rearing in rats: pre and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 859-872, 1998.
- HALL, F. S.; HUANG, S.; FONG, G. W.; SUNDSTROM, J. M.; PERT, A. Differential basis of strain and rearing effects on open-field behavior in Fawn Hooded and Wistar rats. **Physiology and Behavior**, v. 71, p. 525-532, 2000.

- HANSEN, S.; FAHLKE, C.; SODERPALM, A. H.; HARD, E. Significance of adrenal corticosteroid secretion for the food restriction-induced enhancement of alcohol drinking in the rat. **Psychopharmacology**, v. 121, p. 213-221, 1995.
- HARFORD, T. C.; PARKER, D. A.; GRANT, B. F.; DAWSON, D. A. Alcohol use and dependence among employed men and women in the United States in 1998. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 16, p. 146-148, 1998.
- HEILIG, M.; SODERPALM, B.; ENGEL, J. A.; WIDERLOV, E. Centrally administered neuropeptide Y (NPY) produces anxiolytic-like effects in animal anxiety models. **Psychopharmacology**, v. 98, p. 524-529, 1989.
- HEILIG, M.; MCLEOD, S.; BROT, M.; HEINRICHS, S. C.; MENZAGHI, F.; KOOB, G. F.; BRITTON, K. T. Anxiolytic-like action of neuropeptide Y: mediation by Y1 receptors in amygdala, and dissociation from food intake effects. **Neuropsychopharmacology**, v. 8, p. 357-363, 1993.
- HENNIGER, M. S.; OHL, F.; HOLTER, S. M.; WEISSENBACHER, P.; TOSCHI, N.; LORSCHER, P.; WIGGER, A.; SPANAGEL, R.; LANDGRAF, R. Unconditioned anxiety and social behavior in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 111, p. 153-163, 2000.
- HENNIGER, M. S.; SPANAGEL, R.; WIGGER, A.; LANDGRAF, R.; HOLTER, S. M. Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, p. 729-736, 2002.
- HRUBEC, Z.; OMENN, G. S. Evidence of genetic predisposition to alcoholic cirrhosis and psychosis: twin concordances for alcoholism and its biological end points by zygosity among veterans. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 5, p. 207-215, 1981.
- IMHOF, J. T.; COELHO, Z. M.; SCHMITT, M. L.; MORATO, G. S.; CAROBREZ, A. P. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural Brain Research**, v. 56, p. 177-180, 1993.
- IZIDIO, G. S.; LOPES, D. M.; SPRICIGO, L. JR.; RAMOS, A. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes, Brain and Behavior**, v. 4, p. 412-419, 2005.
- IZIDIO, G. S.; RAMOS, A. Positive association between ethanol consumption and anxiety-related behaviors in two selected rat lines. **Alcohol**, v. 41, p. 517-524, 2007.
- JOHANSSON, A. K.; BERGVALL, A. H.; HANSEN, S. Behavioral disinhibition following basal forebrain excitotoxin lesions: alcohol consumption, defensive aggression, impulsivity and serotonin levels. **Behavioural Brain Research**, v. 102, p. 17-29, 1999.

- JONES, G. H.; HERNANDEZ, T. D.; KENDALL, D. A.; MARSDEN, C. A.; ROBBINS, T. W. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioral responses and postmortem and in vivo neurochemistry. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 43, p. 17-35, 1992.
- KAMPOV-POLEVOY, A.; GARBUTT, J. C.; JANOWSKY, D. Evidence of preference for a high-concentration sucrose solution in alcoholic men. **American Journal of Psychiatry**, v. 154, p. 269-270, 1997.
- KHANNA, J. M.; KALANT, H.; CHAU, A. K.; SHARMA, H. Initial sensitivity, acute tolerance and alcohol consumption in four inbred strains of rats. **Psychopharmacology**, v. 101, p. 390-395, 1990.
- KINRYS, G.; WYGANT, L. E. Anxiety disorders in women: does gender matter to treatment? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 27, p. 43-50, 2005.
- KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science**, v. 278, p. 52-58, 1997.
- KOSTEN, T. A.; MISERENDINO, M. J.; CHI, S.; NESTLER, E. J. Fischer and Lewis rat strains show differential cocaine effects in conditioned place preference and behavioral sensitization but not in locomotor activity or conditioned taste aversion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 269, p. 137-144, 1994.
- LANG, P. J.; DAVIS, M.; OHMAN, A. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. **Journal of Affective Disorders**, v. 61, p. 137-159, 2000.
- LAVIOLA, G.; ADRIANI, W. Evaluation of unconditioned novelty-seeking and d-amphetamine-conditioned motivation in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 1011-1020, 1998.
- LEWEJOHANN, L.; REINHARD, C.; SCHREWE, A.; BRANDEWIEDE, J.; HAEMISCH, A.; GORTZ, N.; SCHACHNER, M.; SACHSER, N. Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavior tests. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, p. 64-72, 2006.
- MAISONNETTE, S.; MORATO, S.; BRANDAO, M. L. Role of resocialization and of 5-HT_{1A} receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. **Physiology and Behavior**, v. 54, p. 753-758, 1993.
- MARINELLI, P. W.; QUIRION, R.; GIANOULAKIS, C. Estradiol valerate and alcohol intake: a comparison between Wistar and Lewis rats and the putative role of endorphins. **Behavioural Brain Research**, v. 139, p. 59-67, 2003.
- MARQUENIE, L. A.; SCHADE, A.; VAN BALKOM, A. J.; COMIJS, H. C.; DE GRAAF, R.; VOLLEBERGH, W.; VAN DYCK, R.; VAN DEN BRINK, W. Origin of the

- comorbidity of anxiety disorders and alcohol dependence: findings of a general population study. **European Addiction Research**, v. 13, p. 39-49, 2007.
- MASHIMO, T.; VOIGT, B.; TSURUMI, T.; NAOI, K.; NAKANISHI, S.; YAMASAKI, K.; KURAMOTO, T.; SERIKAWA, T. A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and genetically defined rat strains. **BMC Genetics**, v. 7; p. 19, 2006.
- MCBRIDE, W. J.; KERNS, R. T.; RODD, Z. A.; STROTHER, W. N.; EDENBERG, H. J.; HASHIMOTO, J. G.; WIREN, K. M.; MILES, M. F. Alcohol effects on central nervous system gene expression in genetic animal models. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, v. 29, p. 167-175, 2005.
- MORATO, S.; CASTRECHINI, P. Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p. 707-710, 1989.
- MULDER, R. T. Alcoholism and personality. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 36, p. 44-52, 2002.
- OHLMEIER, M. D.; PETERS, K.; TE WILDT, B. T.; ZEDLER, M.; ZIEGENBEIN, M.; WIESE, B.; EMRICH, H. M.; SCHNEIDER, U. Comorbidity of alcohol and substance dependence with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Alcohol and Alcoholism**, v. 43, p. 300-304, 2008.
- OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, v. 27, p. 282-293, 1963.
- OROSZI, G.; GOLDMAN, D. Alcoholism: genes and mechanisms. **Pharmacogenomics**, v. 5, p. 1037-1048, 2004.
- OVERSTREET, D. H.; REZVANI, A. H.; PARSIAN, A. Behavioural features of alcohol-preferring rats: focus on inbred strains. **Alcohol and Alcoholism**, v. 34, p. 378-385, 1999.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.
- POHORECKY, L. A.; BLAKLEY, G. G.; MA, E. W.; SOINI, H. A.; WIESLER, D.; BRUCE, K. E.; NOVOTNY, M. V. Social housing influences the composition of volatile compounds in the preputial glands of male rats. **Hormones and Behavior**, v. 53, p. 536- 545, 2008.

- PRESCOTT, C. A.; KENDLER, K. S. Genetic and environmental contributions to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of male twins. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, p. 34-40, 1999.
- RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, p. 57-69, 1997.
- RAMOS, A.; MELLERIN, Y.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. **Behavioural Brain Research**, v. 96, p. 195-205, 1998.
- RAMOS, A.; MORMEDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 22, p. 33-57, 1998.
- RAMOS, A.; MOISAN, M. P.; CHAOULOFF, F.; MORMEDE, C.; MORMEDE, P. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular Psychiatry**, v. 4, p. 453-462, 1999.
- RAMOS, A.; KANGERSKI, A. L.; BASSO, P. F.; DA SILVA SANTOS, J. E.; ASSREUY, J.; VENDRUSCOLO, L. F.; TAKAHASHI, R. N. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. **Behavioural Brain Research**, v. 129, p. 113-123, 2002.
- RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, p. 493-498, 2008.
- RAMOS, A.; PEREIRA, E.; MARTINS, G. C.; WEHRMEISTER, T. D.; IZIDIO, G. S. Integrating the open Field, elevated plus-maze and light/dark box to assess different types of emotionality behaviors in one single trial. **Behavioural Brain Research**, v. 193, p. 277-288, 2008.
- REGIER, D. A.; FARMER, M. E.; RAE, D. S.; LOCKE, B. Z.; KEITH, S. J.; JUDD, L. L.; GOODWIN, F. K. Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) study. **Journal of the American Medical Association**, v. 264, p. 2511-2518, 1990.
- REZVANI, A. H.; PARSIAN, A.; OVERSTREET, D. H. The Fawn-Hooded (FH/Wjd) rat: a genetic animal model of comorbid depression and alcoholism. **Psychiatric Genetics**, v. 12, p. 1-16, 2002.
- RODD, Z. A.; BERTSCH, B. A.; STROTHER, W. N.; LE-NICULESCU, H.; BALARAMAN, Y.; HAYDEN, E.; JEROME, R. E.; LUMENG, L.; NURNBERGER, J. I.; EDENBERG, H. J.; MCBRIDE, W. J.; NICULESCU, A. B. Candidate genes, pathways and mechanisms for alcoholism: an expanded convergent functional genomics approach. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 7, p. 222-256, 2007.

- ROSEN, J. B.; SCHILKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychological Review**, v. 105, p. 325-350, 1998.
- RUSSELL, V. A. Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 166, p. 1-14, 2007.
- SAGVOLDEN, T.; RUSSELL, V. A.; AASE, H.; JOHANSEN, E. B.; FARSHBAF, M. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1239-1247, 2005.
- SAHAKIAN, B. J.; ROBBINS, T. W.; MORGAN, M.; IVERSEN, S. D. The effects of psychomotor stimulants on stereotypy and locomotor activity in socially-deprived and control rats. **Brain Research**, v. 84, p. 195-205, 1974.
- SCHUCKIT, M. A.; HESSELBROCK, V. Alcohol dependence and anxiety disorders: what is the relationship? **American Journal of Psychiatry**, v. 151, p. 1723-1734, 1994.
- SHER, K. J.; BARTHOLOW, B. D.; WOOD, M. D. Personality and substance use disorders: a prospective study. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 68, p. 818-829, 2000.
- SOUBRIÉ, P. Serotonergic neurons and behavior. **J Pharmacol**, v. 17, p. 107-112, 1986.
- SPANAGEL, R.; MONTKOWSKI, A.; ALLINGHAM, K.; STÖHR, T.; SHOAIB, M.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. **Psychopharmacology**, v. 122, p. 369-373, 1995.
- STANLEY, B. G.; CHIN, A. S.; LEIBOWITZ, S. F. Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. **Brain Research Bulletin**, v. 14, p. 521-524, 1985.
- STERNBERG, E. M.; GLOWA, J. R.; SMITH, M. A.; CALOGERO, A. E.; LISTWAK, S. J.; AKSENTIJEVICH, S.; CHROUSOS, G. P.; WILDER, R. L.; GOLD, P. W. Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. **Brain Research**, v. 570, p. 54-60, 1992.
- STEWART, R. B.; GATTO, G. J.; LUMENG, L.; LI, T. K.; MURPHY, J. M. Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. **Alcohol**, v. 10, p. 1-10, 1993.
- STÖHR, T.; SZURAN, T.; PLISKA, V.; FELDON, J. Behavioural and hormonal differences between two Lewis rat lines. **Behavioural Brain Research**, v. 101, p. 163-172, 1999.

- SUZUKI, T.; GEORGE, F. R.; MEISCH, R. A. Differential establishment and maintenance of oral ethanol reinforced behavior in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 245, p. 164-170, 1988.
- SWENDSEN, J. D.; MERIKANGAS, K. R.; CANINO, G. J.; KESSLER, R. C.; RUBIO-STIPEC, M.; ANGST, J. The comorbidity of alcoholism with anxiety and depressive disorders in four geographic communities. **Comprehensive Psychiatry**, v. 39, p. 176-184, 1998.
- THORSELL, A.; SLAWECKI, C. J.; EL KHOURY, A.; MATHE, A. A.; EHLERS, C. L. The effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 28-34, 2006.
- TOYE, A. A.; COX, R. Behavioral genetics: anxiety under interrogation. **Current Biology**, v. 11, p. 473-476, 2001.
- TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 44, p. 463-469, 1993.
- VAN DER STAAY, F. J.; STECKLER, T. The fallacy of behavioral phenotyping without standardization. **Genes, Brain and Behavior**, v. 1, p. 9-13, 2002.
- VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Social interactions in adolescent and adult Sprague-Dawley rats: Impact of social deprivation and test context familiarity. **Behavioral Brain Research**, v. 188, p. 398-405, 2008.
- VENDRUSCOLO, L. F.; TERENCE-RIGALDIE, E.; RABA, F.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N.; MORMÈDE, P. Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, p. 441-450, 2006.
- VENDRUSCOLO, L. F.; VENDRUSCOLO, J. C. M.; TERENCE-RIGALDIE, E.; RABA, F.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N.; MORMÈDE, P. Genetic influences on behavioral and neuroendocrine responses to predator-odor stress in rats. **Neuroscience Letters**, v. 409, p. 89-94, 2006.
- VIGLINSKAYA, I. V.; OVERSTREET, D. H.; KASHEVSKAYA, O. P.; BADISHTOV, B. A.; KAMPOV-POLEVOY, A. B.; SEREDENIN, S. B.; HALIKAS, J. A. To drink or not to drink: tests of anxiety and immobility in alcohol-preferring and alcohol-nonpreferring rat strains. **Physiology and Behavior**, v. 57, p. 937-941, 1995.
- VOIKAR, V.; POLUS, A.; VASAR, E.; RAUVALA, H. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. **Genes, Brain and Behavior**, v. 4, p. 240-252, 2005.

- WAHLSTEN, D.; BACHMANOV, A.; FINN, D. A.; CRABBE, J. C. Stability of inbred mouse strain differences in behavior and brain size between laboratories and across decades. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, p. 16364-16369, 2006.
- WALTERS, G. D. The heritability of alcohol abuse and dependence: a meta-analysis of behavior genetic research. **American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, v. 28, p. 557-584, 2002.
- WEISS, I. C.; FELDON, J.; DOMENEY, A. M. Isolation rearing-induced disruption of prepulse inhibition: further evidence for fragility of the response. **Behavioural Pharmacology**, v. 10, p. 139-149, 1999.
- WEISS, I. C.; PRYCE, C. R.; JONGEN-RELO, A. L.; NANZ-BAHR, N. I.; FELDON, J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 152, p. 279-295, 2004.
- WONGWITDECHA, N.; MARSDEN, C. A. Social isolation increases aggressive behavior and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. **Behavioural Brain Research**, v. 75, p. 27-32, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Mental Health and Substance Abuse. About global alcohol database. **World Health Organization Press**, Geneva, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Mental Health and Substance Abuse. Global status report on alcohol. **World Health Organization Press**, Geneva, 2004.
- WÜRBEL, H. Behavioral phenotyping enhanced beyond (environmental) standardization. **Genes, Brain and Behavior**, v. 1, p. 3-8, 2002.